

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIENCIAS E TECNOLOGIA

ESTUDOS ESPECTROSCOPICOS
DE
HIDROGENASES BACTERIANAS

PAPEL DO NIQUEL NO
METABOLISMO DE HIDROGENIO

POR

MIGUEL NUNO SEPULVEDA DE GOUVEIA TEIXEIRA

Tese apresentada para
obtenção do grau de
Doutor em Química

LISBOA, 1986

AGRADECIMENTOS

O trabalho apresentado nesta Tese foi realizado no Grupo de Biofisica Molecular do Centro de Quimica Estrutural do Complexo Interdisciplinar I, INIC, sob a orientação do Prof. Doutor José J. G. Moura. A realização deste trabalho não teria sido possível sem a contribuição de diversas pessoas e entidades, às quais expresso aqui os meus agradecimentos.

Ao Prof. Dr. José J. G. Moura agradeço a forma excelente como sempre orientou esta Tese, bem como o seu continuo estímulo e interesse pelo trabalho que efectuei, para além das melhores condições de trabalho e da excelente formação científica que me proporcionou.

A Prof. Dr^a Isabel M. G. Moura, um agradecimento especial pela sua continua colaboração e orientação ao longo de todas as etapas do trabalho apresentado nesta Tese.

Ao Prof. Dr. António V. Xavier quero agradecer o ter-me aceite como estagiário no seu grupo de investigação, bem como o esforço constante que tem desenvolvido para criar excelentes condições de trabalho no Grupo de Biofisica Molecular. Agradeço também a sua continua colaboração e interesse pelo trabalho que realizei.

Ao Prof. Jean LeGall (Equipe Commune d' Enzymologie, CNRS-CEA, Cadarache, e Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens), devo um agradecimento particular pela sua contribuição fundamental para o estudo das bactérias redutoras de sulfato e por ter isolado pela primeira vez algumas das hidrogenases estudadas neste trabalho, bem como pela sua constante colaboração nos estudos que realizei.

Ao Prof. B.H.Huynh agradeço a sua colaboração constante e

a realização dos estudos de espectroscopia de Mössbauer apresentados nesta Tese, que foram determinantes para a interpretação dos resultados obtidos neste trabalho.

Aos Drs. H.D.Peck, Jr., D.V.DerVartanian (Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens), Y.Berlier, G.Fauque e P.A.Lespinat (Equipe Commune d'Enzymologie, CNRS-CEA, Cadarache) agradeço a sua colaboração para o trabalho desenvolvido.

A Isabel Pacheco agradeço a sua colaboração em todo o trabalho experimental realizado. Ao Eng.º Fernando Matos agradeço a constante manutenção do espectrômetro de RPE.

Aos meus colegas do Centro de Química Estrutural agradeço a sua amizade e colaboração em diversas fases do meu trabalho, em particular ao Pedro Teixeira Gomes e ao Fernando Pina pelas suas sugestões e constante interesse pelo trabalho que realizei.

A Critina Costa agradeço a sua colaboração no trabalho docente, que me permitiu dedicar quase exclusivamente à realização da Tese na sua parte final.

A todos os meus colegas do Grupo V, António Xavier, Ana Rosa Lino, Belarmino Barata, Fernando Matos, Guida Martinez, Isabel Coutinho, Isabel Maria, Isabel Moura, Isabel Pacheco, Jorge Lampreia, Helena Santos e Zé Moura agradeço a sua constante amizade e estímulo.

Agradeço também às instituições que financiaram os projectos de investigação em que o trabalho apresentado nesta tese se insere: JNICT, INIC, NATO e AID.

Por último, agradeço à Ligia o seu constante encorajamento e estímulo ao longo de todo o período em que realizei este trabalho, sem os quais esta Tese não teria sido possível.

INDICE

i) <u>RESUMO</u>	11
ii) <u>ABSTRACT</u>	19
ii) <u>INDICE DE FIGURAS</u>	27
iii) <u>INDICE DE TABELAS</u>	33
iv) <u>ABREVIATURAS E UNIDADES</u>	36
- <u>NOTA PREVIA</u> -	39
<u>I-HIDROGENASES: CARACTERISTICAS GERAIS E FUNCAO METABOLICA</u>	
<u>Papel da hidrogenase na Producao de hidrogenio e metano</u>	43
I.1- <u>Caracteristicas gerais de hidrogenases</u>	47
I.2- <u>Bacterias redutoras de sulfato</u>	48
I.2.1- <u>Enzimas e proteínas envolvidas na reducao dissimilativa de sulfato</u>	49
I.3- <u>Bacterias Metanogênicas</u>	53
I.3.1- <u>Ciclo biológico do carbono</u>	53
I.3.2- <u>Proteínas, cofactores e enzimas envolvidas na metanogênese</u> ..	54
I.4- <u>Papel da hidrogenase na bioenergética das bactérias redutoras de sulfato e metanogênicas</u>	56
I.4.1- <u>Bacterias redutoras de sulfato</u>	56
I.4.2- <u>Bacterias metanogênicas</u>	62
I.5- <u>Interacções microbianas- Transferência de hidrogenio Interespécies</u>	64
I.6- <u>Relevância econômica e ecológica das bactérias redutoras de sulfato e metanogênicas</u>	66
1.6.1- <u>Bacterias redutoras de sulfato</u>	66
1.6.2- <u>Bacterias metanogênicas</u>	68
I.7- <u>Aplicações biotecnológicas da enzima hidrogenase</u>	69
I.8- <u>Referências</u>	73
<u>II-PROPRIEDADES GERAIS DO NIQUEL: Sua relevância em sistemas biológicos</u>	77

II.1-Níquel em sistemas biológicos	79
II.1.1-Urease	79
II.1.2-CO desidrogenase	81
II.1.3-Cofactor F430	83
II.2-Propriedades do níquel no contexto da sua actividade biológica	84
II.2.1-Propriedades Atômicas do níquel	85
II.2.2-Estados de oxidação do níquel	86
II.2.2.1-Estado de oxidação Níquel (I)	89
-Ligandos Macroclícos-	89
-Ligandos Ditiolenos-	91
-Outros Ligandos-	92
II.2.2.2-Estado de oxidação Níquel(III)	93
-Ligandos Peptídicos-	94
-Ligandos Macroclícos-	98
-Outros Ligandos-	99
II.2.2.3- Determinação do estado de oxidação de iões Níquel	100
II.2.4-Coordenação de complexos de níquel	102
-Níquel(0), Níquel(I)-	103
-Níquel(II)-	103
-Níquel(III), Níquel(IV)-	104
II.3-Sistemas Modelo da enzima Hidrogenase	104
II.3.1-Bisditiolenos de níquel	105
II.3.2-Complexo Pd-Salen	109
II.3.3-Cloreto de ruténio	111
II.3.4-Hidretos de Níquel	113
II.5-Referências	114
III-PROPRIEDADES GERAIS DE CENTROS FERRO-ENXOFRE	119

III.1- <u>Composição e Estrutura</u>	121
III.2- <u>Espectroscopia de Visível e ultravioleta</u>	123
III.3- <u>Transições redox de centros Ferro-Enxofre</u>	124
III.4- <u>Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica</u> ...	127
III.5- <u>Espectroscopia de Mössbauer</u>	132
III.6- <u>Interconversão entre centros [3Fe-xS] e [4Fe-4S]</u>	136
III.6.1- <u>Conversão por meios químicos</u>	136
III.6.2- <u>Conversão em condições fisiológicas</u>	137
III.7- <u>Extrusão de centros Ferro-Enxofre</u>	139
III.8- <u>Identificação de centros Ferro-Enxofre</u>	141
III.9- <u>Referências</u>	144
IV- <u>ACTIVACAO DE HIDROGENIO PELA HIDROGENASE</u>	149
IV.1- <u>Activação da molécula de Hidrogénio</u>	153
IV.1.1- <u>Activação de hidrogénio por metais de transição</u>	153
IV.1.1.1- <u>Adição oxidativa</u>	155
IV.1.1.2- <u>Cisão homolítica</u>	155
IV.1.1.3- <u>Cisão heterolítica</u>	156
IV.1.2- <u>Activação de hidrogénio pela hidrogenase</u>	157
IV.1.2.1- <u>Conversão de hidrogénio orto/para</u>	157
IV.1.2.2- <u>Permuta de hidrogénio/deutério</u>	158
IV.2- <u>Activação da hidrogenase</u>	163
IV.3- <u>Conclusão</u>	168
IV.4- <u>Referências</u>	169
V- <u>HIDROGENASE DE DESULFOVIBRIO GIGAS</u>	171
V.1- <u>Métodos de purificação da hidrogenase de <i>D.gigas</i></u>	174
- <u>Esquema 1-</u>	174
- <u>Esquema 2-</u>	175

-Esquema 3-	177
V.2- <u>Caracterização Físico-Química</u>	179
V.2.1- <u>Massa Molecular</u>	179
V.2.2- <u>Análise química</u>	179
V.2.3- <u>Espectroscopia de Visível e ultravioleta</u>	180
V.3- <u>Caracterização espectroscópica do estado nativo</u>	181
V.3.1- <u>Identificação do sinal isotrópico por Espectroscopia de RPE e Mössbauer</u>	183
V.3.2- <u>Identificação Inequivoca do sinal rômico :- Substituição isotópica por ^{61}Ni e estudos por RPE</u>	189
V.3.2.1- <u>Simulação dos sinais de RPE de níquel</u>	193
V.3.2.2- <u>Relaxação dos sinais de RPE de níquel</u>	195
- <u>Variação com a temperatura</u> -	195
- <u>Variação com a potência de microondas</u> -	196
V.4- <u>Estados intermediários de redução gerados sob Hidrogénio ou ditionito de sódio</u>	197
V.4.1- <u>Evolução dos sinais de RPE a 77 K</u>	198
V.4.2- <u>Identificação do sinal de RPE a $g=2,19$</u>	200
V.4.3- <u>Estudos do sinal de RPE a $g=2,19$ a baixas temperaturas</u>	203
V.4.4- <u>Centros Fe/S</u>	206
V.4.4.1- <u>Estudos de ressonância paramagnética electrónica</u>	206
V.4.4.2- <u>Espectroscopia de Mössbauer</u>	214
- <u>Centro $[3\text{Fe-xS}]$</u> -	215
- <u>Centros $[4\text{Fe-4S}]$</u> -	219
V.5- <u>Ciclos de redução / oxidação da hidrogenase de <i>D. gigas</i> sob hidrogénio</u>	221
V.6- <u>Outros espécies paramagnéticas detectadas por RPE</u>	228
V.6.1- <u>Sinal de RPE a $g=12$</u>	228
V.6.2- <u>Sinal de RPE a $g=2,28$</u>	229
V.7- <u>Determinação de potenciais redox</u>	231

V.7.1-Sinais de RPE presentes no Estado Nativo	232
V.7.2-Espécies intermediárias	233
V.7.2.1-Titulação com ditionito de sódio	234
V.7.2.2-Titulações sob hidrogénio	235
V.7.3- <u>Caracterização dos sinais de RPE a $g=2.19$ e a $g=2.21$</u> ..	240
V.7.4- <u>Análise das curvas de titulação</u>	247
VI.8- <u>Discussão -Hipóteses Mecanísticas</u>	249
- <u>Reacção enzimática</u> -	250
- <u>Activação da molécula de hidrogénio</u> -	251
- <u>Activação da enzima</u> -	251
- <u>Grupos prostéticos da hidrogenase</u> -	252
V.8.1- <u>Ciclo de activação da hidrogenase de <i>D. gigas</i></u>	254
V.8.1.1-Estado nativo	254
- <u>Centros Fe/S</u> -	254
- <u>Centro de Níquel</u> -	254
V.8.1.2-Estados reduzidos da enzima	258
V.8.2- <u>Ciclo catalítico da hidrogenase de <i>D. gigas</i></u>	265
- <u>Espécies paramagnéticas detectadas por RPE</u> -	266
- <u>Potenciais redox</u> -	266
V.8.2.1- <u>Caracterização do intermediário hidreto</u>	267
V.8.2.1- <u>Modelos para o ciclo catalítico</u>	270
- <u>Modelo I: Ni(III)--Ni(0)</u> -	270
- <u>Modelo II: Ni(III)--Ni(II)</u> -	273
V.9- <u>Referências</u>	279
VI- <u>HIDROGENASES DE <i>DESULFOVIBRIO BACULATUS</i></u>	283
VI.1- <u>Métodos de purificação das hidrogenases de <i>D. baculatus</i></u>	285
VI.1.1- <u>Fracção Periplásmica</u>	285

VI.1.2-Fracções membranar e solúvel	286
VI.1.2.1-Fracção solúvel	287
VI.1.2.2-Fracção Membranar	288
VI.2- <u>Caracterização Fisico-Química</u>	289
VI.2.1-Massa Molecular	289
VI.2.2-Análise química	289
VI.2.3-Espectroscopia de Visível e Ultravioleta	290
VI.3- <u>Estudos de ressonância paramagnética electrónica</u> do estado nativo	291
VI.4- <u>Estudos de ressonância paramagnética electrónica</u> do estado reduzido	294
VI.5-Titulação redox da hidrogenase citoplasmica	302
VI.6-Actividade catalitica	303
VI.6.1-Actividade de produção de H ₂	303
VI.6.2-Actividade de permuta D ₂ /H ⁺	304
VI.7-Referências	306
VII-HIDROGENASE DE <i>DESULFOVIBRIO SALEXIGENS</i>	307
VII.1-Purificação da hidrogenase de <i>D.salexigens</i>	309
VII.1.1-Preparação do extracto bruto	309
VII.1.2-Purificação	309
-Esquema 1-	309
-Esquema 2-	311
VII.2- <u>Caracterização Fisico-Química</u>	312
VII.2.1-Massa Molecular	312
VII.2.2-Análise Química	312
VII.2.3-Espectroscopia de Visível e Ultravioleta	313
VII.3- <u>Estudos de ressonância paramagnética electrónica</u>	314
VII.4-Determinação de potenciais redox	318
VII.5-Actividade Catalitica	320

VII.5.1-Produção de H ₂	320
VII.5.2-Permuta D ₂ /H ⁺	321
VII.6-Conclusão	322
VII.7-Referências	323
VIII-HIDROGENASE DE <i>METHANOSARCINA BARKERI</i>	325
VIII.1-Purificação da hidrogenase de <i>Ms.barkeri</i>	327
VIII.1.1-Preparação do extracto bruto	327
VIII.1.2-Purificação	327
VIII.2- <u>Caracterização Fisico-Química</u>	329
VIII.2.1-Massa Molecular	329
VIII.2.2-Espectroscopia de Visível e Ultravioleta	330
VIII.2.3- <u>Extracção e identificação do grupo flavínico</u>	331
VIII.2.4-Análise Química	333
VIII.3- <u>Estudos de ressonância paramagnética electrónica do estado Nativo</u>	333
VIII.4- <u>Estudos de ressonância paramagnética electrónica de estados reduzidos</u>	336
VIII.5- <u>Actividade catalítica</u>	340
VIII.6-Conclusão	341
VIII.7-Referências	347
IX-HIDROGENASE DE <i>DESULFOVIBRIO DESULFURICANS</i> (ATCC 27774)	351
IX.1- <u>Características Fisico-químicas</u>	353
IX.2- <u>Caracterização espectroscópica do estado nativo-RPE e Mössbauer</u>	355
IX.2.1-Centros Fe/S: <u>Identificação do sinal isotrópico</u>	357
IX.2.2- <u>Identificação do sinal de RPE rômico</u>	358
IX.3- <u>Estados intermediários de redução gerados sob hidrogénio</u> ...	358
IX.4- <u>Actividade catalítica</u>	360
IX-5- <u>Conclusão</u>	361

IX.6- <u>Referências</u>	362
X- <u>ESTUDO COMPARATIVO DAS HIDROGENASES DE DESULFOVIBRIO</u>	363
X.1- <u>Estado nativo de hidrogenases [NiFe]</u>	367
X.1.1- <u>Centro de Niquel</u>	367
X.1.2- <u>Centros Fe/S</u>	372
X.2- <u>Estados intermediários de redução de hidrogenases [NiFe]</u>	375
X.3- <u>Determinação de potenciais redox</u>	380
X.4- <u>Actividade catalitica</u>	382
X.5- <u>Mecanismo Catalitico de hidrogenases [NiFe]</u>	385
X.6- <u>Referências</u>	391
<u>APENDICE</u>	395
A.I- <u>Condições gerais de purificação de proteínas</u>	397
A.I.1- <u>Materiais cromatográficos</u>	398
A.I.1.1- <u>Permuta Iônica</u>	398
A.I.1.2- <u>Adsorção</u>	399
A.I.1.3- <u>Filtração em gel</u>	399
A.II- <u>Métodos Analíticos</u>	399
A.II.1- <u>Determinação de proteína</u>	399
A.II.1.1- <u>Base dos métodos</u>	399
A.II.1.2- <u>Método do Biureto</u>	400
A.II.1.3- <u>Método de Lowry</u>	400
A.II.2- <u>Determinação de metais</u>	401
A.II.2.1- <u>Determinação de Fe- TPTZ</u>	401
A.II.2.2- <u>Determinação de Ni por absorção atômica</u>	403
A.II.2.3- <u>Determinação de Fe, Ni e Se por Emissão de plasma</u>	403
A.II.3- <u>Electroforese</u>	403
A.II.3.1- <u>Pureza das enzimas</u>	403

A.II.3.2-Determinação de massas moleculares	405
A.II.4-Determinação de Massas Moleculares por Filtração em gel ..	407
A.III-Titulação Redox	408
A.III.1-Técnica	408
A.III.2-Análise das curvas de titulação	411
A.IV-Determinação da Actividade Catalítica da Hidrogenase	414
A.IV.1-Produção de Hidrogénio	415
A.IV.2-Consumo de Hidrogénio	416
A.IV.3-Permuta D_2/H^+	417
A.V.-Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica	418
A.V.1-Nocções básicas	419
A.V.2-Parâmetros de RPE	421
A.V.2.1-Factor g	421
A.V.2.2-Constante de acoplamento hiperfino	422
A.V.2.3-Interacção spin-spin	424
A.V.3-Espectro de RPE	426
A.V.4-Quantificação de um Espectro de RPE	427
A.V.4.1-Intensidade de um sinal de RPE	427
A.V.4.2-Correccção para a anisotropia de g	428
A.V.4.3-Integração de um sinal de RPE	429
A.V.6-Dependência de um sinal de RPE com a potência de microondas	429
A.V.7-RPE de metais de transição- Espectros de níquel	431
A.V.8-Instrumentação Utilizada	435
A.VI-Espectroscopia de Mössbauer	435
A.VI.1-Interacção Electrónica hiperfina	437
A.VI.2-Interacção Magnética Hiperfina	437
A.VI-Referências	442

RESUMO

Foram isoladas e caracterizadas hidrogenases de bactérias redutoras de sulfato do gênero *Desulfovibrio* (D.) (*D. gigas*, (NCIB 9332), *D. salaxigens* (estirpe British Guiana, NCIB 8403), *D. baculatus* (estirpe 9974, DSM 1743) e *D. desulfuricans* (ATCC 27774)) e de uma bactéria metanogênica (*Methanosarcina* (Ms.) *barkeri*, DSM 800). Utilizou-se como técnica básica de caracterização a espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), complementada, para a hidrogenase de *D. gigas*, com estudos de espectroscopia de Mössbauer. Todas as enzimas estudadas contêm níquel e centros Fe/S pertencendo ao grupo das hidrogenases [NiFe].

A hidrogenase de *D. gigas* (NCIB 9932), tem uma massa molecular de 89,5 kDa, é composta de duas subunidades não idênticas de 62 e 26 kDa, respectivamente e contém 11 átomo-g de ferro e 1 átomo-g de níquel por mole de enzima. Os átomos de ferro encontram-se agrupados em centros Fe/S: um centro [3Fe-xS] e dois centros [4Fe-4S]^{2+/1+}. No estado nativo todos os centros Fe/S estão no estado oxidado. O centro de níquel contém um ião níquel, provavelmente no estado de oxidação Ni³⁺. Os estudos espectroscópicos de RPE e Mössbauer revelaram a ausência de interações magnéticas entre estes quatro centros metálicos no estado nativo da enzima. O espectro de RPE do estado nativo apresenta essencialmente dois sinais de RPE: um sinal praticamente isotrópico, centrado a g=2,01, detectável a temperaturas até cerca de 30 K, atribuído, através de estudos de Mössbauer, a um centro [3Fe-xS] oxidado (S=1/2); um sinal rômbico, saturado com a potência da radiação de microondas a baixas temperaturas, detectado a temperaturas elevadas (facilmente observável a 77 K), com valores de g

a 2,31 , 2,23 e 2,02 (Sinal Ni-A). Em algumas preparações da hidrogenase é detectável outro sinal rômico, de menor intensidade, com valores de g a 2,33 , 2,16 e 2,02 (Sinal Ni-B) ; a intensidade relativa destes dois sinais rômicos pode ser modificada por ciclos de redução/reoxidação anaeróbica da hidrogenase. Por substituição isotópica com ^{61}Ni foi possível atribuir inequivocamente estes sinais de RPE rômicos a espécies paramagnéticas de níquel, possivelmente Ni(III). A hidrogenase de *D.gigas* foi também isolada a partir de células crescidas em meio enriquecido em ^{57}Fe , o que permitiu realizar estudos detalhados de espectroscopia de Mössbauer nos estados oxidado e reduzidos desta enzima.

Estudou-se a evolução dos espectros de RPE da hidrogenase de *D.gigas* por incubação com o substrato natural (hidrogênio molecular), ou por redução química. Detectaram-se assim diversas espécies paramagnéticas, intermediárias do ciclo catalítico, e determinaram-se os potenciais redox para as transições observadas. O centro $[3\text{Fe-xS}]$ reduz-se a um potencial $E'_0 = -70$ mV; estudos de espectroscopia de Mössbauer revelaram que este centro não sofre interconversão em centros $[4\text{Fe-4S}]$ nos estados reduzidos da enzima. O Sinal Ni A desaparece num processo monoelectrónico com $E'_0 = -220$ mV (pH=8,5), dependente do pH, obtendo-se um estado silencioso em RPE. Os dados de espectroscopia de Mössbauer indicam que neste estado de redução um centro $[4\text{Fe-4S}]$ se encontra reduzido, embora não se observe o sinal de RPE típico a $g=1,94$. Uma possível explicação para este resultado levou a propor que o processo a -220 mV pode estar associado à redução de um centro $[4\text{Fe-4S}]$. O estado silencioso observado em RPE poderá então

resultar de um acoplamento magnético entre o centro de níquel (III) e o centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$. O passo seguinte de redução leva à formação de um novo sinal de RPE rômboico (Sinal Ni-C), com valores de g a 2,19, 2,14 e 2,02, atribuído inequivocamente a níquel por substituição isotópica com ^{61}Ni . Este sinal corresponde a uma espécie intermediária, com um potencial de formação entre -350 e -380 mV (pH=8,5), e desaparecendo num processo com potenciais inferiores a -400 mV. Estudos de RPE a baixas temperaturas destes estados de redução levaram à observação de outros sinais de RPE complexos: i) um sinal com valores de g a 2,21, 2,10 e componentes alargadas a valores mais elevados de campo magnético (sinal a $g=2,21$), de relaxação rápida, formando-se a potenciais inferiores a -330 mV (pH=8,5) e diminuindo de intensidade a potenciais inferiores a -410 mV; ii) sinais com $g_m \sim 1,94$, típicos de centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$. Todos estes dados foram correlacionados com estudos de actividade catalítica da hidrogenase realizados por outros autores, numa tentativa de identificar a função de cada centro metálico, propondo-se um mecanismo molecular de activação e de produção/consumo de hidrogénio por esta hidrogenase.

Foram isoladas três formas de hidrogenase de *D.baculatus* (estirpe 9974, DSM 1743): hidrogenase periplásmica (obtida por lavagem das células), hidrogenase membranaar (obtida por solubilização a partir de fracções particulares) e hidrogenase citoplásmica (obtida por ruptura das células). Não foram realizados estudos detalhados de localização que permitam comprovar a origem topológica de cada uma daquelas fracções; a sua designação traduz apenas o modo como foram obtidas. As hidrogenases de *D.baculatus*

são compostas de duas subunidades não idênticas e contêm ferro, níquel e selênio. No estado oxidado possuem características espectroscópicas (RPE) diferentes. A hidrogenase membranar apresenta dois sinais de RPE rômnicos, com valores de g a 2,34 , 2,16 e $\sim 2,02$ e a 2,33 , 2,23 e $\sim 2,02$, semelhantes aos sinais Ni-B e Ni-A da hidrogenase de *D.gigas*; a temperaturas inferiores a 30 K detecta-se um sinal quase isotrópico centrado a $g=2,01$, de fraca intensidade, correspondendo possivelmente a um centro $[3Fe-xS]$. A hidrogenase periplásmica apresenta um sinal de RPE rômnico, com valores de g a 2,12 , 2,06 e 2,02, possivelmente devido a uma espécie paramagnética de níquel, e um sinal isotrópico semelhante ao observado na hidrogenase membranar. A hidrogenase citoplásmica é praticamente silenciosa em RPE no estado nativo. Nos estados de redução sob hidrogénio ou com redutores químicos as três hidrogenases de *D.baculatus* apresentam espectros de RPE idênticos. A temperaturas baixas observam-se dois tipos de sinais: um sinal de relaxação rápida, com valores de g superiores a 2, análogo ao sinal a " $g=2,21$ " da hidrogenase de *D.gigas*, e sinais a $g_m \sim 1,94$, atribuídos a pelo menos dois centros $[4Fe-4S]$ reduzidos; a temperaturas superiores a 20 K, detecta-se um sinal de RPE rômnico, com valores de g a 2,22 , 2,16 e 2,01, com características semelhantes ao sinal Ni-C da hidrogenase de *D.gigas*. Por titulação redox sob hidrogénio da hidrogenase citoplásmica a $pH=7,6$ foram determinados os potenciais redox associados ao aparecimento deste sinal (entre -300 e -380 mV) e ao seu desaparecimento (inferior a -420 mV). Foi também estudada a actividade catalítica destas hidrogenases na reacção de permuta D_2/H^+ , verificando-se que a razão H_2/HD é dependente do pH e, a $pH=7,6$, é superior a 1.

A hidrogenase de *D.salexigens* (estirpe British Guiana, NCIB 8403) tem uma massa molecular de 98 kDa, é também constituída por duas subunidades não idênticas e contém 8-10 átomo-g de ferro, 1 átomo-g de níquel e 1 átomo-g de selênio por mole de enzima. No estado nativo é praticamente silenciosa em RPE; no estado reduzido sob H_2 detectam-se sinais de RPE análogos aos das hidrogenases atrás referidas: a baixa temperatura observam-se sinais de RPE com $g_m \sim 1,94$, possivelmente devidos a dois centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ reduzidos e sinais complexos de relaxação rápida com características semelhantes ao sinal a $g="2,21"$ da hidrogenase de *D.gigas*; a temperaturas superiores a 20 K observa-se um sinal rômico com valores de g a 2,22, 2,16 e 2,02, semelhante ao sinal Ni-C. Foram realizadas titulações redox sob hidrogénio para esta hidrogenase, a pH=7,6: o sinal a $g=2,22$ forma-se a potenciais inferiores a -300 mV, atinge uma intensidade máxima a cerca de -380 mV e decresce de intensidade novamente a potenciais inferiores; o sinal a $g="2,21"$ forma-se a potenciais inferiores a -330 mV e atinge uma intensidade máxima a cerca de -400 mV, decrescendo ligeiramente de intensidade a potenciais mais negativos. A razão H_2/HD na reacção de permuta D_2/H^+ catalisada por esta hidrogenase, a pH=7,6, é superior a 1.

A hidrogenase de *D.desulfuricans* (ATCC 27774) apresenta características muito semelhantes às da hidrogenase de *D.gigas*: tem uma massa molecular de 75,5 kDa, é constituída por duas subunidades diferentes de massas moleculares de 58,2 e 26,2 kDa, respectivamente, e contém 11 átomo-g de ferro e 1 átomo-g de níquel por mole de enzima; no estado nativo detecta-se um sinal de RPE isotrópico a $g=2,01$ correspondente a um centro $[3Fe-xS]_{ox}$

e um sinal rômico com valores de g a 2,33 , 2,16 e 2,02, idêntico ao sinal Ni-B da hidrogenase de *D.gigas*. Estudos de Mössbauer no estado nativo revelaram ainda a presença de dois centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ no estado oxidado; nos estados reduzidos sob hidrogénio observam-se sinais de RPE do tipo Ni-C (valores de g a 2,19 , 2,14 e 2,02) e a $g=2,21$. A razão H_2/HD na reacção de permuta D_2/H^+ é inferior a 1 a pH=7,6.

Isolou-se também uma hidrogenase solúvel de um organismo metanogénico metabolicamente versátil, *Methanosarcina barkeri* (DSM 800). Esta hidrogenase contém 8 átomo-g de ferro, 1 átomo-g de níquel e uma mole de FMN ou riboflavina por massa molecular mínima de 60 kDa. A hidrogenase de *Ms.barkeri* reduz o cofactor F_{420} na presença de hidrogénio. No estado nativo apresenta um sinal de RPE rômico, de fraca intensidade, com valores de g a 2,24 , 2,20 e 2,02, para além de um sinal isotrópico, detectável a temperaturas superiores a 20 K, possivelmente devidos a uma espécie de níquel e a um radical semi-quinona, respectivamente. No estado reduzido sob hidrogénio ou por adição de ditionito de sódio observam-se sinais de RPE a baixas temperaturas com $g_m \sim 1,94$, atribuídos a dois centros $[4Fe-4S]^{1+}$, e , a temperaturas superiores a 30 K, sinais complexos com valores de g superiores a 2, possivelmente associados a múltiplas espécies de níquel. As propriedades desta hidrogenase são comparadas com os dados disponíveis para hidrogenases isoladas de bactérias metanogénicas.

Os dados físico-químicos das hidrogenases $[NiFe]$ de *Desulfovibrio* são discutidos, propondo-se um mecanismo comum para a produção e consumo de hidrogénio por estas hidrogenases.

O trabalho realizado mostrou as potencialidades das espectroscopias de Ressonância Paramagnética Eletrônica e de Mössbauer no estudo de metaloenzimas complexas contendo centros paramagnéticos e de ferro, levando à caracterização da estrutura e constituição dos grupos prostéticos de hidrogenases contendo níquel e centros ferro-enzofre. Em particular, estas técnicas espectroscópicas permitiram o estudo detalhado da função do centro de níquel nas hidrogenases e a observação de espécies intermediárias relevantes para o ciclo catalítico destas enzimas. Evidenciou-se também a importância do uso de isótopos com propriedades espectroscópicas determinantes ^{61}Ni e ^{57}Fe que possibilitaram a identificação inequívoca de algumas espécies paramagnéticas contendo níquel e ferro, bem como a otimização da utilização da espectroscopia de Mössbauer.

ABSTRACT

Hydrogenases from sulfate reducing bacteria of the *Desulfovibrio* (*D.*) genus (*D.gigas* (NCIB 9332), *D.salexigens* (strain British Guiana, NCIB 8403), *D.baculatus* (strain 9974, DSM 1743) and *D.desulfuricans* (ATCC 27774)) and also from a methanogenic bacteria (*Methanosarcina barkeri*, DSM 800) were isolated and characterized by Electronic Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy. The studies performed on *D.gigas* hydrogenase were further complemented using Mössbauer spectroscopy data. All the enzymes studied contain nickel and iron-sulfur centers, belonging to the group of [NiFe] hydrogenases.

D.gigas (NCIB 9332) hydrogenase has a molecular mass of 89 kDa, is composed of two non-identical subunits of 62 and 26 kDa, respectively and contains 11 g-atom of iron and 1 g-atom of nickel per mole of enzyme. The iron atoms are arranged in Fe/S clusters: one [3Fe-xS] and two [4Fe-4S]^{2+/1+} centers. In the native state all the Fe/S clusters are in the oxidized state. The nickel center contains a nickel ion probably in the Ni³⁺ state. EPR and Mössbauer spectroscopic data show the absence of magnetic interactions between these four metallic centers in the enzyme native state. The EPR spectrum of *D.gigas* hydrogenase native state presents basically two EPR signals: an almost isotropic signal, centered at g=2.02, detectable at temperatures up to 30 K, assigned through Mössbauer studies to a [3Fe-xS] oxidized center (S=1/2), and a rhombic signal, saturated with microwave power at low temperatures (well observed at 77 K), with g-values at 2.31, 2.23 and 2.02 (Ni-signal A). In some *D.gigas*

hydrogenase preparations it is observed another rhombic signal, of lower intensity, with g values at 2.33, 2.16 and 2.02 (Ni-Signal B); the relative intensity of these two rhombic signals can be modified by anaerobic cycles of reduction/reoxidation of the hydrogenase. By ^{61}Ni isotopic substitution it was possible to unambiguously assign these rhombic EPR signals to paramagnetic nickel species, probably Ni(III). *D. gigas* hydrogenase was also isolated from cells grown in a ^{57}Fe enriched medium, what allowed detailed Mössbauer studies of the oxidized and reduced states of the enzyme.

The evolution of the hydrogenase EPR spectra after incubation with the natural substrate (molecular hydrogen) or by chemical reduction indicated the presence of several paramagnetic species, intermediates of the catalytic cycle. The redox potentials for the observed transitions were determined by redox titrations followed by EPR spectroscopy. The [3Fe-xS] center reduction occurs at $E'_0 = -70$ mV; Mössbauer spectroscopy studies revealed that this center does not interconvert into a [4Fe-4S] cluster in the reduced states of the enzyme. The Ni-Signal A disappears in a monoelectronic process, pH dependent, at $E'_0 = -220$ mV (at pH=8.5), leading to an EPR silent state. The Mössbauer data show that in this state one [4Fe-4S] center is reduced, although it is not observed the typical $g_m = 1.94$ EPR signal. A possible explanation for this observation led us to propose that the process at -220 mV is the reduction of the [4Fe-4S] center, that magnetically couples to the nickel paramagnetic center, resulting in the EPR silent state. The next step of reduction leads to the formation of a new EPR rhombic signal (Ni-Signal C),

with g - values at 2.19, 2.14 and 2.02, unambiguously assigned to a nickel species by ^{61}Ni isotopic substitution. This signal corresponds to an intermediate species, appearing at redox potentials between -350 and -380 mV (pH=8.5), and disappearing in a process with redox potentials below -400 mV. Low temperature EPR studies of these reduction states showed the presence of other complex EPR signals: i) a rapid relaxing signal, with g - values at 2.21, 2.10 and broad components at higher magnetic fields (termed the " $g=2.21$ " signal), appearing at redox potentials below -330 mV (pH=8.5), attaining maximum intensity at about -400 mV and decreasing in intensity at lower redox potentials; ii) $g_m=1.94$ signals, typical of $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ centers. All this data is correlated with hydrogenase activity studies, in an attempt to identify the catalytic function of each metallic center. This correlation led to the proposition of a molecular mechanism for the activation and production/consumption of hydrogen by this hydrogenase.

Three different forms of hydrogenase were isolated from *D.baculatus* (strain 9974, DSM 1743): a periplasmic hydrogenase (obtained by cell washing), a membrane-bound hydrogenase (obtained by solubilization from particulate fractions) and a cytoplasmic hydrogenase (obtained by cell rupture). Detailed localization studies were not performed, so as to prove the topological origin of each fraction; their designation reflects only the way by which they were obtained. *D.baculatus* hydrogenases are composed of two non-identical subunits and contain iron, nickel and selenium. In the oxidized state these hydrogenase fractions show different EPR characteristics. The

membrane bound enzyme presents two rhombic EPR signals, with g-values at 2.33, 2.23 and ~2.0, and at 2.34, 2.16 and ~2.0, similar to the *D.gigas* hydrogenase Ni-Signals A and B; at temperatures below 30 K an almost isotropic signal of low intensity, centered at $g=2.02$, is detected, corresponding probably to a $[3Fe-xS]$ oxidized center. The periplasmic hydrogenase shows a rhombic EPR signal with g-values at 2.12, 2.06 and 2.02, possibly due to a paramagnetic nickel species, and an isotropic signal identical to the one found for the membrane bound hydrogenase. The cytoplasmic hydrogenase is almost EPR silent in the native state. However, after reduction under hydrogen or by chemical methods, the three *D.baculatus* hydrogenase fractions show similar EPR spectra. At low temperatures two types of signals are observed: a fast relaxing signal, with g-values higher than 2, similar to the *D.gigas* hydrogenase "g=2.21" signal, and $g_m=1.94$ signals assigned to at least two $[4Fe-4S]^{1+}$ centers. At temperatures above 20 K, a rhombic signal is observed, with g-values at 2.22, 2.16 and 2.01, analogous to *D.gigas* hydrogenase Ni-signal C. A redox titration of the cytoplasmic hydrogenase, under hydrogen and at pH=7.6, gave the redox potential values associated with the appearance (between -300 and -340 mv) and the disappearance (below -420 mV) of this signal. Studies of the catalytic activity of *D.baculatus* hydrogenases in the D_2/H^+ exchange reaction revealed that the H_2/HD ratio is pH dependent and higher than 1 at pH 7.6

D.salexigens (strain British Guiana, NCIB 8403) hydrogenase is also composed of two subunits, has a molecular mass of 98 kDa and contains 8-10 g-atom of iron, 1 g atom of

nickel and 1 g-atom of selenium. In the native state this hydrogenase is almost EPR silent, but EPR signals similar to those above mentioned for the other hydrogenases were detected in the hydrogen reduced states. At low temperatures signals at $g_m=1.94$, probably due to two $[4Fe-4S]^{1+}$ centers, and a fast relaxing signal with similar characteristics to *D.gigas* hydrogenase "g=2.21" signal are observed. At temperatures above 20 K a rhombic EPR signal with g-values at 2.22, 2.16 and 2.02 is present, analogous to Ni-signal C. Redox titrations under H_2 were also performed, at pH=7.6, for this hydrogenase: the g=2.22 signal develops below -300 mV, attains a maximum intensity at about -380 mV and decreases in intensity at lower redox potentials; the "g=2.21" signal appears below -330 mV and reaches the maximum intensity at -400 mV; at lower redox potentials its intensity decreases slightly. The H_2/HD ratio in the D_2/H^+ exchange reaction catalyzed by this hydrogenase is higher than 1 at pH=7.6.

D.desulfuricans (ATCC 27774) hydrogenase has very similar characteristics to *D.gigas* hydrogenase. It has a molecular mass of 75,5 kDa, is composed of two non-identical subunits of 58.2 and 26.2 kDa, respectively, and contains 11 g-atom of iron and 1 g-atom of nickel per mole of enzyme. The EPR spectrum of its native state shows an isotropic signal centered at g=2.02, assigned to an oxidized $[3Fe-xS]$ center and a rhombic signal with g-values at 2.33, 2.16 and 2.02 analogous to Ni-signal B of *D.gigas* hydrogenase. Mössbauer studies of the native state revealed also the presence of two $[4Fe-4S]^{2+}$ clusters. In the hydrogen reduced state two sets of signals are detected: a

rhombic signal at $g=2.19$, 2.14 and 2.02 (Ni-signal C) and a " $g=2.21$ " signal. The H_2/HD ratio in the D_2/H^+ exchange reaction is lower than 1 at pH 7.6.

A soluble hydrogenase was isolated from a metabolic versatile methanogenic bacteria - *Methanosarcina barkeri* (DSM 800). This hydrogenase contains 8 g-atom of iron, about 1 g-atom of nickel and a flavin group per minimal molecular mass of 60 kDa. *Ms.barkeri* hydrogenase reduces the F_{420} cofactor under H_2 . In the native state it shows a rhombic EPR signal, of low intensity, with g values at 2.24, 2.20 and 2.0, and an isotropic signal at $g=2.00$, detectable at temperatures higher than 20 K, probably due to a nickel paramagnetic species and a semiquinone radical, respectively. In the hydrogen reduced states this hydrogenase presents EPR signals at $g_m=1.94$, assigned to two $[4Fe-4S]^{1+}$ centers and, at temperatures above 30 K, complex EPR signals with g values higher than 2, possibly associated with multiple nickel species. The properties of this hydrogenase are compared with the available data for hydrogenases isolated from methanogenic bacteria.

The physico-chemical properties of the [NiFe] hydrogenases isolated from *Desulfovibrio* sp. are compared and discussed, being proposed a common mechanism for the production and consumption of hydrogen by these enzymes.

The work presented in this Thesis allowed the characterization of the structure and constitution of metallic centers of nickel-iron-sulfur containing hydrogenases and, in particular, the detailed study of the nickel center function in the activation of the hydrogen molecule by these enzymes. It is

worthwhile to stress that the EPR technique is a particularly sensitive probe for detecting the nature of the nickel site, the nickel oxidation states involved, mid-point redox potentials and the catalytic role of nickel in hydrogen metabolism. EPR and Mössbauer spectroscopic techniques, used in conjunction, gave decisive clues for the characterization of the complex hydrogenase enzyme. The use of metal isotope enrichments, such as with ^{61}Ni and ^{57}Fe isotopes, is also illustrated, enabling unambiguously the assignment of nickel and iron EPR signals and increasing the experimental sensitivity of Mössbauer spectroscopy.

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Ciclo biológico do Enxofre	49
Figura I.2: Ciclo do carbono através de metano na biosfera	54
Figura I.3: Reacções de transferência electrónica na metanogénese	56
Figura I.4: Ciclos de reciclagem de hidrogénio (A) e de transformação de traços de hidrogénio (B)	59
Figura I.5: Esquema da síntese de ATP acoplada à metanogénese a partir de CO_2 e H_2	63
Figura I.6: <u>Transferência de hidrogénio interespecies</u>	65
Figura I.7: Sistemas utilizados na fotólise da água	71
Figura I.8: Produção de compostos de química fina por sistemas enzimáticos	73
Figura II.1: Sinais de RPE de CO desidrogenase de <i>C. thermoaceticum</i> a 77 K	81
Figura II.2: Estrutura do cofactor F_{430}	84
Figura II.3: Bisditiolenos de metais de transição	105
Figura II.4: Ciclo catalítico para a produção de hidrogénio a partir de ditiolenos de níquel	107
Figura III.1: Estruturas básicas de centros Fe/S	121
Figura III.2: Estruturas alternativas para centros $[\text{3Fe-4S}]$	123
Figura III.3: Espectros de Vis/UV de proteínas contendo centros Fe/S	124
Figura III.4: Potenciais redox de centros Fe/S	125
Figura III.5: Espectros de RPE de centros Fe/S	129
Figura III.6: Espectros de Mössbauer de centros Fe/S	134
Figura III.7: Interconversão de centros $[\text{3Fe-xS}]$ e $[\text{4Fe-4S}]$	138
Figura III.8: Representação esquemática das reacções de extrusão	140
Figura IV.1: Dependência da razão H_2/HD com o pH, para a hidrogenase de <i>D. baculatus</i>	161
Figura IV.2: Dependência da actividade de permuta isotópica da hidrogenase de <i>D. baculatus</i> com o pH	162

Figura IV.3:	Activação da hidrogenase de <i>D.gigas</i> na reacção de permuta D_2/H^+	165
Figura IV.4:	Dependência da activação da hidrogenase <i>D.gigas</i> sob H_2 com o potencial redox	167
Figura IV.5:	Actividade da hidrogenase de <i>D.gigas</i> em função do potencial redox	168
Figura V.1:	Espectro de visível e ultravioleta da hidrogenase de <i>D.gigas</i>	181
Figura V.2:	Espectros de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> no estado nativo	182
Figura V.3:	Espectros de RPE do sinal isotrópico da hidrogenase e da Fd II de <i>D.gigas</i> nativas	184
Figura V.4:	Espectro de Mössbauer da hidrogenase de <i>D.gigas</i> no estado nativo, em abundância natural de ^{57}Fe	185
Figura V.5:	Espectro de Mössbauer da hidrogenase de <i>D.gigas</i> no estado nativo, enriquecida em ^{57}Fe	187
Figura V.6:	Sinais de RPE de diferentes preparações da hidrogenase de <i>D.gigas</i> nativa	190
Figura V.7:	Sinais de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> nativa, em abundância natural e enriquecida em ^{61}Ni	192
Figura V.8:	Sinais de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> após ciclos de redução/reoxidação	193
Figura V.9:	Sinal de RPE de níquel - <u>Ni-A</u> da hidrogenase de <i>D.gigas</i> - Sinais experimentais e Sinais simulados	194
Figura V.10:	Variação da intensidade do <u>sinal Ni-A</u> com a temperatura	195
Figura V.11:	Variação da intensidade dos sinais <u>Ni-A</u> e <u>Ni-B</u> com a potência de microondas	196
Figura V.12:	Espectros de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> sob H_2 ..	199
Figura V.13:	Sinal a $g="2,19"$ da hidrogenase de <i>D.gigas</i> reduzida sob hidrogénio	201
Figura V.14:	Variação da intensidade do <u>Sinal Ni-C</u> com a potência da radiação de microondas	202
Figura V.15:	Dependência com a temperatura dos sinais de RPE de um estado intermediário de redução da hidrogenase de <i>D.gigas</i> sob hidrogénio	204

Figura V.16:	Variação com a potência de microondas dos sinais a $g=2,21$ e a $g=2,19$ de uma amostra da hidrogenase de <i>D.gigas</i> reduzida sob H_2	205
Figura V.17:	Sinal a $g=2,21$ obtido para a hidrogenase de <i>D.gigas</i> reduzida sob hidrogênio	206
Figura V.18:	Sinais de RPE de estados intermediários de redução da hidrogenase de <i>D.gigas</i> obtidos sob hidrogênio ou com ditionito de sódio	207
Figura V.19:	Sinais de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> reduzida com quantidades subestequiométricas de ditionito de sódio	209
Figura V.20:	Sinais de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> reduzida com excesso de ditionito de sódio	210
Figura V.21:	Sinais de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> reduzida com excesso de ditionito de sódio, ao fim de um tempo de redução mais longo	211
Figura V.22:	Sinais de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> reduzida sob hidrogênio	212
Figura V.23:	Espectro de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> reduzida sob H_2	214
Figura V.24:	Espectro de Mössbauer da hidrogenase de <i>D.gigas</i> a -80 mV	216
Figura V.25:	Espectros de Mössbauer da hidrogenase de <i>D.gigas</i> reduzida sob H_2 a -80 mV, -270 mV e -400 mV	218
Figura V.26:	Espectro de RPE do citocromo c_3 tetrahêmico de <i>D.gigas</i>	222
Figura V.27:	Ciclo de redução/oxidação da hidrogenase de <i>D.gigas</i> Ensaio: Ciclo 2	224
Figura V.28:	Ciclo de redução/oxidação da hidrogenase de <i>D.gigas</i> Ensaio: Ciclo 3	225
Figura V.29:	Sinais de RPE a baixa temperatura de uma amostra de hidrogenase de <i>D.gigas</i> reduzida sob H_2 na presença de citocromo c_3 tetrahêmico de <i>D.gigas</i>	227
Figura V.30:	Sinal de RPE a $g=12$ da hidrogenase de <i>D.gigas</i> parcialmente reduzida sob hidrogênio	229
Figura V.31:	Sinal de RPE a $g=2,28$ da hidrogenase de <i>D.gigas</i> parcialmente reduzida sob hidrogênio	230
Figura V.32:	Titulação redox dos sinais de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> no estado nativo	233

Figura V.33:	Titulação redox do sinal a $g=2,19$ da hidrogenase de <i>D.gigas</i> por adição de ditionito de sódio	234
Figura V.34:	Evolução dos sinais de RPE a 20 K ao longo da titulação redox sob H_2 da hidrogenase de <i>D.gigas</i> ...	236
Figura V.35:	Evolução dos sinais de RPE a 4 K ao longo da titulação redox sob H_2 da hidrogenase de <i>D.gigas</i> ...	237
Figura V.36:	Titulação redox dos sinais intermediários da hidrogenase de <i>D.gigas</i> sob H_2	238
Figura V.37:	Variação do sinal de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> a -313 mV com a potência de microondas	241
Figura V.38:	Variação do sinal de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> a -353 mV com a potência de microondas	242
Figura V.39:	Variação do sinal de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> a -393 mV com a potência de microondas	243
Figura V.40:	Variação do sinal de RPE da hidrogenase de <i>D.gigas</i> a -440 mV com a potência de microondas	244
Figura V.41:	Sinais de RPE a 4 (A) e 20 K (B) da hidrogenase de <i>D.gigas</i> a -353 mV. C- Espectro de diferença A-B .	245
Figura V.42:	Sinais de RPE a 4 (A) e 20 K (B) da hidrogenase de <i>D.gigas</i> a -442 mV. C- Espectro de diferença A-B .	246
Figura V.43:	Curva de titulação redox para o sinal a $g="2,19"$ da hidrogenase de <i>D.gigas</i>	248
Figura V.44:	Ciclo catalítico para a produção de hidrogênio a partir de ditiolenos de níquel	273
Figura VI.1:	Espectro de visível da hidrogenase periplásmica nativa de <i>D.baculatus</i>	291
Figura VI.2:	Espectros de RPE das hidrogenases nativas de <i>D.baculatus</i>	292
Figura VI.3:	Sinais de RPE das hidrogenases de <i>D.baculatus</i> reduzidas sob hidrogênio	295
Figura VI.4:	Espectros de RPE da hidrogenase periplásmica de <i>D.baculatus</i> reduzida sob hidrogênio	297
Figura VI.5:	Espectros de RPE da hidrogenase periplásmica de <i>D.baculatus</i> reduzida ao fim de um tempo de incubação mais longo sob hidrogênio	298
Figura VI.6:	Espectros de RPE da hidrogenase citoplásmica de <i>D.baculatus</i> reduzida sob hidrogênio	299

Figura VI.7:	Espectros de RPE da hidrogenase periplasmica de <i>D.baculatus</i> reduzida com ditonito de sódio	301
Figura VI.8:	Curva de titulação redox sob hidrogênio do sinal a $g=2,22$ da hidrogenase citoplasmica de <i>D.baculatus</i>	302
Figura VI.9:	Dependência com o pH da actividade de permuta D_2/H^+ da hidrogenase periplasmica de <i>D.baculatus</i>	304
Figura VI.10:	Variação com o pH da razão H_2/HD na reacção de permuta catalisada pela hidrogenase citoplasmica de <i>D.baculatus</i>	305
Figura VII.1:	Espectro de visível e ultravioleta da hidrogenase de <i>D.salexigens</i>	313
Figura VII.2:	Espectro de RPE da hidrogenase de <i>D.salexigens</i> no estado nativo	314
Figura VII.3:	Espectros de RPE da hidrogenase de <i>D.salexigens</i> reduzida sob hidrogênio (-380 mV)	315
Figura VII.4:	Dependência dos sinais de RPE da hidrogenase de <i>D.salexigens</i> reduzida sob H_2 com a potência de microondas	316
Figura VII.5:	Sinais de RPE da hidrogenase de <i>D.salexigens</i> reduzida sob hidrogênio (-450 mV)	317
Figura VII.6:	Titulação Redox da hidrogenase de <i>D.salexigens</i>	319
Figura VII.7:	Cinética da reacção de permuta isotópica D_2/H^+ catalisada pela hidrogenase de <i>D.salexigens</i>	321
Figura VIII.1:	Espectro de visível e ultravioleta da hidrogenase de <i>Ms.barkeri</i>	330
Figura VIII.2:	Espectros de emissão de fluorescência da hidrogenase de <i>Ms.barkeri</i>	332
Figura VIII.3:	Espectros de RPE da hidrogenase nativa de <i>Ms.barkeri</i>	334
Figura VIII.4:	Dependência com a temperatura da intensidade do sinal de RPE a $g=2,24$ da hidrogenase de <i>Ms.barkeri</i>	335
Figura VIII.5:	Espectros de RPE da hidrogenase de <i>Ms.barkeri</i> parcialmente reduzida sob hidrogênio	337
Figura VIII.6:	Espectros de RPE da hidrogenase de <i>Ms.barkeri</i> reduzida	339
Figura VIII.7:	Actividade de produção de hidrogênio pela hidrogenase de <i>Ms.barkeri</i> em função do pH	341

Figura IX.1:	Espectros de RPE da hidrogenase nativa de <i>D.desulfuricans</i>	356
Figura IX.2:	Espectros de RPE da hidrogenase de <i>D.desulfuricans</i> reduzida sob hidrogênio	359
Figura X.1:	Sinais de RPE de níquel de hidrogenases [NiFe] nativas de <i>Desulfovibrio</i>	369
Figura X.2:	Espectros de RPE a baixa temperatura de hidrogenases [NiFe] nativas de <i>Desulfovibrio</i>	373
Figura X.3:	Espectros de RPE de hidrogenases [NiFe] de <i>Desulfovibrio</i> no estado reduzido -Sinal <u>Ni-C</u>	376
Figura X.4:	Espectros de RPE a baixa temperatura de hidrogenases [NiFe] de <i>Desulfovibrio</i> reduzidas- Sinal "g=2,21" ...	378
Figura X.5:	Curvas de titulação redox seguidas por RPE para as hidrogenases de <i>D.salexigens</i> , <i>D.gigas</i> e <i>D.baculatus</i> .	381
Figura X.6:	Ciclos de activação e catalítico para hidrogenases [NiFe] de <i>Desulfovibrio</i>	389
Figura A.1:	Célula de Titulação Redox	408
Figura A.2:	Curvas de titulação redox da hidrogenase de <i>D.gigas</i> .	414
Figura A.3:	Reactor usado para a reacção de permuta D_2/H^+	417
Figura A.4:	Espectros de RPE de níquel, de isótopos com $I=0$ e $I=3/2$	423
Figura A.5:	Desdobramento a campo zero para um sistema com $S=5/2$.	425
Figura A.6:	Dependência com a potência de microondas de um sinal de RPE	430
Figura A.7:	Diagramas de desdobramento de orbitais d para iões Ni(I) e Ni(III)	433
Figura A.8:	Espectros de Mössbauer esquemáticos traduzindo diversos tipos de interacção hiperfina	438

INDICE DE TABELAS

TABELA I.1:	Exemplos de organismos apresentando actividade hidrogenásica	45
TABELA I.2:	Centros activos em proteínas de <i>D.gigas</i>	51
TABELA I.3:	Localização de Enzimas e Proteínas de Transferência electrónica em <i>Desulfovibrio</i>	52
TABELA I.4:	Coenzimas e proteínas isoladas de Metanogenos	55
TABELA I.5:	Energias livres para a oxidação de etanol e formação de metano	65
TABELA II.1:	Níquel em sistemas biológicos	80
TABELA II.2:	Propriedades atômicas do níquel	85
TABELA II.3 :	Átomos doadores que estabilizam os estados de oxidação Ni(I) e Ni(III)	87
Tabela II.4:	Potenciais de redução de compostos de Ni(II) e sinais de RPE dos produtos de redução	90
Tabela II.5:	Valores de g de compostos de Ni(I) com ligandos nitrogenados	93
TABELA II.6:	Potenciais de oxidação de peptido complexos de Ni(II) e valores de g dos sinais de RPE dos produtos de Ni(III)	95
TABELA II.7:	Geometrias e números de coordenação mais frequentes em complexos de níquel	102
TABELA III.1:	Estados de oxidação de centros Fe/S	125
TABELA III.2:	Sinais de RPE típicos de centros Fe/S	130
TABELA III.3:	Parâmetros de Mössbauer de centros Fe/S	135
TABELA III.4:	Identificação de centros Fe/S	142
TABELA IV.1:	Razões iniciais dos produtos de permuta isotópica ..	159
TABELA IV.2:	Dependência da actividade de permuta isotópica com o pH	162
TABELA V.1:	Esquemas de purificação da hidrogenase de <i>D.gigas</i> ...	178
TABELA V.2:	Conteúdo em metais e S* a hidrogenase de <i>D.gigas</i>	180
TABELA V.3:	Características dos sinais de RPE isotrópicos da Fd II e da hidrogenase de <i>D.gigas</i>	183

TABELA V.4:	Parâmetros de Mössbauer para os centros [3Fe-xS] _{ox} das hidrogenases de <i>D.gigas</i> e <i>D.desulfuricans</i> e da Fd II de <i>D.gigas</i>	189
TABELA V.5:	Parâmetros de acoplamento hiperfino nos sinais de RPE de Níquel da hidrogenase de <i>D.gigas</i>	194
TABELA V.6:	Potência de meia-saturação dos <u>sinais Ni-A</u> e <u>Ni-B</u> ...	197
TABELA V.7:	Parâmetros de RPE do <u>Sinal Ni-C</u>	200
TABELA V.8:	Parâmetros de Mössbauer para os centros [3Fe-xS] _{red} da hidrogenase e da Fd II de <i>D.gigas</i>	217
TABELA V.9:	Intensidade máxima da espécie intermediária em função de E ₁ -E ₂	248
TABELA V.10:	Estados de oxidação do níquel na hidrogenase de <i>D.gigas</i>	272
TABELA VI.1:	Massa Molecular das hidrogenases de <i>D.baculatus</i>	289
TABELA VI.2:	Conteúdo em metais das hidrogenases de <i>D.baculatus</i> .	290
TABELA VI.3:	Espectros de visível das hidrogenases de <i>D.baculatus</i>	291
TABELA VI.4:	Sinais de RPE das hidrogenases de <i>D.baculatus</i>	294
TABELA VI.5:	Actividade catalítica das hidrogenases de <i>D.baculatus</i>	303
TABELA VII.1:	Purificação da hidrogenase de <i>D.salexigens</i>	311
TABELA VII.2:	Propriedades Fisico-Químicas da hidrogenase de <i>D.salexigens</i>	322
TABELA VIII.1:	Purificação da hidrogenase de <i>Ms.barkeri</i>	328
TABELA VIII.2:	Identificação do cromóforo flavínico da hidrogenase de <i>Ms. barkeri</i>	332
TABELA VIII.3:	Características Fisico-Químicas de hidrogenases isoladas de organismos Metanogénicos	342
TABELA IX.1:	Propriedades Fisico-Químicas da hidrogenase II de <i>D.desulfuricans</i>	355
TABELA X.1:	Comparação das propriedades Fisico-Químicas de hidrogenases [NiFe] de <i>Desulfovibrio</i>	366
TABELA X.2:	Sinais de RPE de Hidrogenases [NiFe] nativas de <i>Desulfovibriones</i>	368

TABELA X.3: Sinais de RPE de Hidrogenases [NiFe] de <i>Desulfovi-</i> <i>briones</i> , reduzidas sob H ₂	377
TABELA X.4: Sinais de RPE detectados em hidrogenases [NiFe] de <i>Desulfovibrio</i>	386
Tabela A.1: Mediadores Redox utilizadas nas titulações	410
Tabela A.2: Valores de P_B para vários valores de E e n_1	413
Tabela A.3: Elementos de matriz para acoplamento orbital	432

ABREVIATURAS E UNIDADES

A - Absorvância

A. - *Azotobacter*

A₁ - Constante de acoplamento hiperfino (mT- miliTesla)

ADP - Adenosinadifosfato

ATP - Adenosinatrifosfato

APS - Adeninafosfosulfato

ATCC - American Type Culture Collection

B. - *Bacillus*

C. - *Clostridium*

Ch. - *Chromatium*

cis - cisteína

CoA - Coenzima A

CoM - Coenzima M

D. - *Desulfovibrio*

Da - Dalton

DC - Dicroísmo circular

DCM - Dicroísmo circular magnético

DSM - Deutsche Sammlung von Mikro-organismen

DEAE - Dietil-amino-etil celulose

DMSO - Dimetilsulfóxido

E. - *Escherichia*

E₀' - Potencial redox formal em relação ao eléctrodo padrão de hidrogénio (V- Volt; mV - miliVolt)

ENH - Eléctrodo normal de hidrogénio

ESC - Eléctrodo saturado de calomelanos

EDTA - Acido etilenodiaminotetracético

EXAFS - Extended X-Ray Absorption Fine Structure

[Fe] (Hydrogenases) - Hydrogenases contendo apenas centros [Fe-S]

Fd - Ferredoxina
 FAD - Flavina-Adenina-Dinucleótido
 FMN - Flavina mononucleótido
 g - Factor g
 g_{\min} - g mínimo
 g_{med} - g médio
 g_{\max} - g máximo
 g_m - valor de g médio: $g_m = 1/3 (g_{\min} + g_{\text{med}} + g_{\max})$
 $g_{||}$ - g paralelo
 g_{\perp} - g perpendicular
 gli - glicina
 H - campo magnético (T - Tesla; mT - miliTesla)
 His - Histidina
 HPLC - High Pressure Liquid Chromatography
 HTP - Hidroxilapatite
 HASE - Hidrogenase
 HIPIIP - High Potential Iron Protein
 I - Spin nuclear
 K - grau Kelvin
 M - molar (mM - milimolar)
M. - *Micrococcus*
Mb. - *Methanobacterium*
Ms. - *Methanosarcina*
 MV - Metil viologénio
 mnt - malenonitriloditiolato
 nm - nanómetro
 [NiFe] (Hidrogenases) - Hidrogenases contendo níquel e centros [Fe-S]
 NCIB - National Collection of Industrial Bacteria

ox - oxidado

P - Potência da radiação de microondas (Watt)

P_{1/2} - Potência de meia saturação (Watt)

R. - *Rhodopseudomonas*

Rb - rubredoxina

red - reduzido

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RPE - Ressonância Paramagnética Eletrônica

S - spin eletrônico

S* - Enxofre lábil

Sinal Ni-A - Sinal de RPE de níquel da hidrogenase de *D.gigas*, com valores de g a 2,31 , 2,23 e 2,02

Sinal Ni-B - Sinal de RPE de níquel da hidrogenase de *D.gigas*, com valores de g a 2,33 , 2,16 e 2,02

Sinal Ni-C - Sinal de RPE de níquel da hidrogenase de *D.gigas* reduzida, com valores de g a 2,19 , 2,14 e 2,02

Sinal a g="2,21" - Sinal de RPE da hidrogenase de *D.gigas* reduzida, com valores de g a 2,21 , 2,10 e componentes alargadas a campo magnético mais alto

T - Tesla (10⁴ Gauss)

T. - *Thermus*

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

TPTZ - 2,4,6 tripiridil-s-triazina

UV - Ultravioleta

Vis - Visível

ϵ - absorvidade molar ($M^{-1}.cm^{-1}$)

δ - desvio isomérico (mm/s)

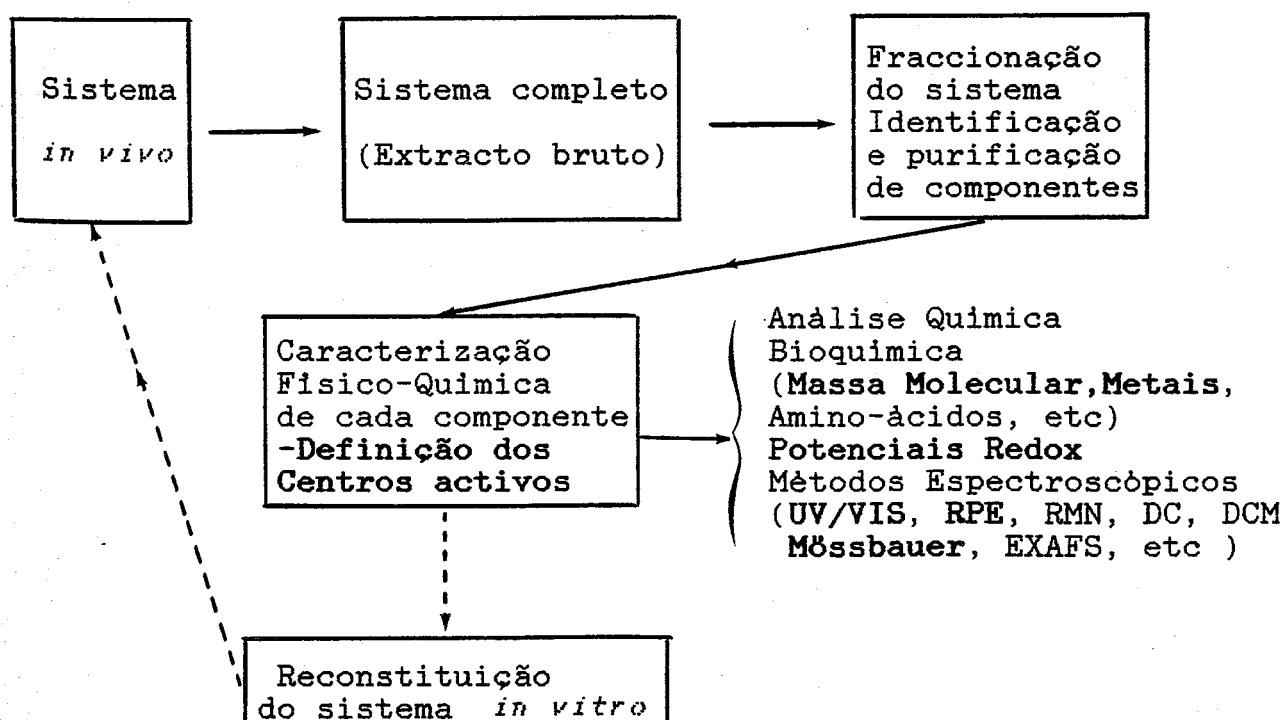
ΔE_Q - Desdobramento de Quadrupolo (mm/s)

λ - comprimento de onda (nm)

λ - constante de acoplamento hiperfino

NOTA PREVIA

As bactérias redutoras de sulfato e as bactérias metanogénicas estão envolvidas em processos microbianos de relevância económica, como por exemplo processos de produção de energia, corrosão e poluição. Para um controlo eficaz dos processos envolvidos é necessário adquirir toda uma série de dados, nomeadamente a caracterização da população microbiana presente nesses sistemas e o estudo das características fisiológicas e do metabolismo de cada organismo. Uma etapa fundamental para o conhecimento detalhado do metabolismo é o isolamento e a caracterização das proteínas constituintes de cada bactéria (definição do equipamento enzimático). No trabalho desenvolvido nesta tese foi estudada a enzima hidrogenase isolada de bactérias redutoras de sulfato, do género *Desulfovibrio*, e de uma bactéria metanogénica. A metodologia usada está representada esquematicamente no diagrama seguinte.



Após a ruptura da parede celular de cada organismo (destruição da organização celular) obtém-se um extracto bruto e procede-se à sua fraccionação, purificando-se cada componente. Segue-se então a caracterização físico-química destes componentes isolados, que envolve inicialmente a determinação de propriedades básicas: massa molecular, subunidades, ponto isoeléctrico, actividade enzimática e conteúdo em metais. O passo seguinte consiste na caracterização dos centros activos de cada enzima. Para este efeito foram utilizadas neste trabalho técnicas espectroscópicas: espectroscopia de Visível e Ultravioleta, espectroscopia de Mössbauer e, como técnica básica, a espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE). A utilização destas duas últimas técnicas foi possível uma vez que a hidrogenase contém centros paramagnéticos e centros de ferro. Na posse destes dados pode então estudar-se a relação entre a estrutura de cada centro enzimático e a sua função na actividade catalítica da enzima e determinar os diversos estados intermediários da enzima no processo catalítico (com especial relevo para a interacção com substratos). O trabalho efectuado teve como principal objectivo a caracterização espectroscópica dos centros activos das hidrogenases e o estudo do mecanismo molecular da reacção catalítica.

Uma extensão natural do trabalho realizado envolve a reconstituição *in vitro* dos vários percursos metabólicos, começando-se por estudar a interacção entre proteínas duas a duas e, progressivamente, complicando-se o sistema por introdução de novos componentes, numa tentativa de reproduzir o sistema *in vivo*. Assim, foram realizados alguns estudos preliminares de interacção entre a enzima hidrogenase e o citocromo c_3 te-

trahémico, ferredoxinas e, para a hidrogenase de bactérias metanogénicas, o cofactor F_{420} .

Outro dado importante que pode ser obtido por estes estudos é a caracterização de estruturas enzimáticas que desenvolvem reacções com elevada especificidade e reactividade em condições suaves de temperatura e pressão, que podem servir como modelos para a síntese de sistemas biomiméticos que permitam realizar as mesmas reacções numa escala laboratorial ou mesmo industrial.

O trabalho realizado é apresentado de acordo com o seguinte esquema:

- O Capitulo I é um resumo bibliográfico, descrevendo-se as características gerais da enzima hidrogenase e o metabolismo dos organismos redutores de sulfato e metanogénicos, realçando-se o papel central da hidrogenase neste metabolismo;
- Nos Capítulos II e III apresentam-se dados da química de compostos de níquel e características gerais de proteínas simples contendo centros ferro/enxofre, que servirão como base de informação para a caracterização da enzima complexa que é a hidrogenase;
- No Capitulo IV são discutidos os mecanismos gerais que têm sido propostos para a actividade catalítica da hidrogenase, nomeadamente para o modo de activação da molécula de hidrogénio;
- Os Capítulos V a IX apresentam o trabalho experimental desenvolvido na caracterização físico-química das hidrogenases isoladas de bactérias redutoras de sulfato do género *Desulfovibrio* (D.) - *D.gigas* (Capitulo V), *D.baculatus* (Cap. VI), *D.salexigens*

(Cap. VII), *D.desulfuricans* (ATCC 27774) (Cap. IX)- e de uma bactéria metanogênica - *Methanosarcina barkeri* (Cap.VIII). A hidrogenase de *D.gigas* foi estudada com maior detalhe, sendo os dados obtidos para esta hidrogenase utilizados como referência para as hidrogenases isoladas de outros organismos;

- No Capitulo X efectua-se um estudo comparativo das várias hidrogenases estudadas, discutindo-se a possibilidade da existência de um mecanismo reaccional comum às hidrogenases contendo centros Fe/S e níquel;

- As técnicas experimentais utilizadas neste trabalho são descritas detalhadamente em Apêndice.

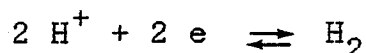
CAPÍTULO I:

HIDROGENASES

- CARACTERÍSTICAS GERAIS E FUNÇÃO METABOLICA

Papel da Hidrogenase na Produção de Hidrogênio e Metano

A Hidrogenase (EC.1.12.) é uma enzima que catalisa a reacção de oxidação-redução mais simples



desempenhando um papel fundamental no metabolismo de numerosos microorganismos (1-6). Está envolvida em percursos metabólicos que envolvem quer a oxidação de H_2 , (fonte energética), quer a redução de protões (aceitantes terminais de electrões de cadeias de transferência electrónica). Na Tabela I.1 apresentam-se as classes e alguns exemplos de microorganismos nos quais tem sido detectada a presença de actividade hidrogenásica ou a partir dos quais se têm isolado estas enzimas.

TABELA I.1: Exemplos de organismos apresentando actividade hidrogenásica (1,2)

CLASSE	ORGANISMO
<u>Bactérias Procariontes</u>	
-Anaeróbicas: Redutoras de Sulfato Metanogénicas	<i>Desulfovibrio</i> <i>Methanobacterium</i> <i>Clostridium</i>
-Facultativas:	<i>E.coli</i>
-Fotossintéticas	<i>Chromatium</i> <i>Thiocapsa</i>
-Aeróbicas	<i>Alcaligenes</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Nocardia</i>
-Aeróbicas Fixadoras de azoto	<i>Azotobacter</i> <i>Rhizobia</i>
-Cianobactérias	<i>Anabaena</i>
<u>Eucariontes</u>	Algas

A molécula de hidrogénio possui propriedades químicas e físicas significantes para sistemas biológicos: calor de combustão elevado, alta difusividade e permeabilidade em membranas biológicas, ao contrário do seu produto de oxidação, o protão, que, de acordo com a hipótese quimiosmótica, não é permeável nestas membranas. Assim, os organismos que têm a capacidade de oxidar hidrogénio na superfície externa da membrana citoplásmica têm a possibilidade de gerar gradientes de protões sem a intervenção de ciclos de Mitchell típicos. A enzima hidrogenase pode realizar a translocação de protões, uma característica fundamental para a bioenergética destes organismos (3-5).

O hidrogénio desempenha um papel importante nas cadeias anaeróbicas de degradação de matéria orgânica, sendo produzido por bactérias fermentativas, fotossintéticas e fixadoras de azoto e utilizado por diversos grupos de bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Muitas bactérias fermentativas utilizam a hidrogenase como uma "válvula energética". Este processo permite a libertação de excesso de poder redutor, levando à produção de H_2 e obtenção de energia por fosforilação a nível de substrato, ou o consumo de H_2 (como doador de electrões) em processos geradores de energia e em vias biossintéticas.

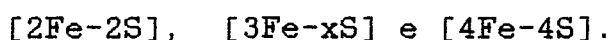
O hidrogénio aparece também envolvido como uma espécie fundamental em associações microbianas de organismos produtores e consumidores de H_2 , através dum processo designado por "Transferência de hidrogénio inter-espécies" (3). Esta transferência é tão efectiva que o nível de hidrogénio extracelular é mínimo nos biótopos onde existem aquelas associações. O hidrogénio produzido nestes ecossistemas é

geralmente utilizado por organismos metanogénicos, como redutor de CO_2 para a produção de CH_4 .

O papel do hidrogénio como intermediário no ciclo de degradação de matéria orgânica é posto em evidência pelo facto de H_2 e CO_2 serem convertidos em metano e de a produção microbiana deste gás ser bastante superior às reservas de combustível fóssil (gás natural) existentes (1).

I.1- Características gerais de hidrogenases

Apesar da simplicidade da reacção catalisada por esta enzima, a constituição dos centros activos de hidrogenases isoladas de diferentes organismos apresenta uma grande diversidade. A única característica comum a todas as enzimas até agora purificadas é o facto de consistirem em enzimas contendo sempre centros ferro-enxofre $[\text{Fe-S}]$, com 4 a 12 átomos de ferro por molécula, organizados em agregados de estruturas básicas conhecidas (2,3):



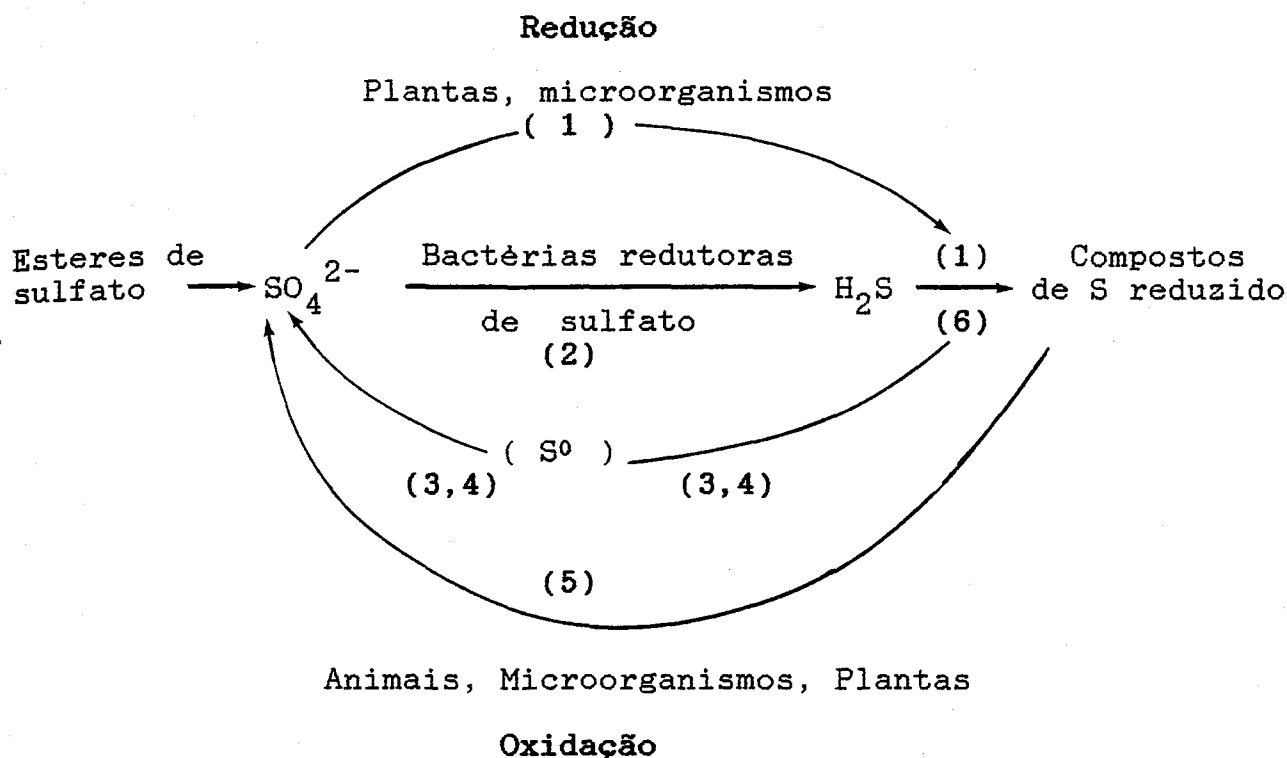
Algumas hidrogenases contêm ainda outros grupos prostéticos: grupos flavínicos (FMN ou FAD) e níquel (em geral, 1 mole de Ni por mole de enzima). Em relação à composição em centros activos os dados disponíveis parecem indicar a existência de dois tipos de hidrogenase: enzimas contendo apenas centros $[\text{Fe-S}]$, designadas por hidrogenases $[\text{Fe}]$; hidrogenases contendo níquel e centros $[\text{Fe-S}]$, designadas por hidrogenases $[\text{NiFe}]$. As do primeiro tipo são representadas pelas hidrogenases de *D.vulgaris* e *C.pasteurianum* e contêm um a dois centros $[4\text{Fe-4S}]$ e um centro $[\text{Fe-S}]$ de características invulgares (7,8,9,10); as do segundo

tipo são encontradas em variadíssimos organismos, sendo a hidrogenase de *D.gigas* considerada o protótipo destas enzimas (11,12). A presença de grupos flavínicos só tem sido detectada no segundo grupo de enzimas.

Neste trabalho foram isoladas hidrogenases apenas do tipo [NiFe], pelo que a discussão das propriedades destas enzimas nos capítulos posteriores se limitará a este tipo de enzima. Nas alíneas seguintes serão descritas brevemente as principais características dos organismos de que se isolaram hidrogenases neste trabalho: bactérias redutoras de sulfato e metanogénicas, realçando-se o papel central desempenhado pela hidrogenase no seu metabolismo.

I.2-Bactérias redutoras de sulfato

As bactérias redutoras de sulfato realizam a redução de compostos de enxofre, em reacções relevantes para o ciclo biológico deste elemento (Figura I.1). Os organismos do género *Desulfovibrio* são o único grupo bacteriano que participa claramente na Transferência de Hidrogénio Inter-espécies, funcionando como organismos produtores ou consumidores de hidrogénio (1-3). O estudo do metabolismo do hidrogénio molecular e da enzima hidrogenase é determinante para a compreensão da bioquímica e fisiologia da redução dissimilativa de sulfato, bem como para o estudo da transferência de hidrogénio interespecies em processos complexos de fermentação como a metanogénese (3).



- (1) - Assimilação de sulfato ; (2) - Redução dissimilativa de sulfato ; (3) - Oxidação quimolitotrófica de compostos de S reduzidos ; (4) - Oxidação fotolitotrófica de compostos de S reduzidos ; (5) - Oxidação de tóxis a sulfato ; (6) - Dessulfuração de tóxis orgânicos

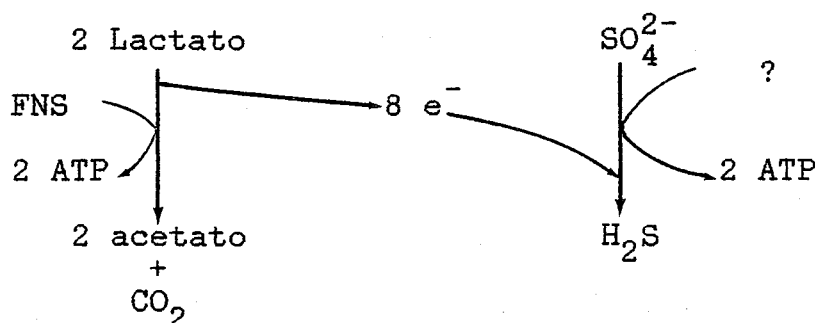
Figura I.1: Ciclo biológico do Enxofre (13)

As várias transformações do enxofre neste ciclo biológico podem ser assimilativas ou dissimilativas. Em condições aeróbicas a redução de sulfato é assimilativa (por ex., em plantas e microorganismos), enquanto a oxidação dos compostos de enxofre é dissimilativa para a maioria das bactérias. Em condições anaeróbicas os compostos de enxofre oxidado ou reduzido são substratos apenas para processos metabólicos bacterianos.

I.2.1-Enzimas e proteínas envolvidas na redução dissimilativa de sulfato

As bactérias redutoras de sulfato usam este composto de enxofre como aceitante de electrões para processos catabólicos de oxidação, formando-se H_2S .

Este processo de respiração designa-se por redução dissimilativa de sulfato, estando acoplado à síntese de ATP (14).



FNS- Fosforilação a Nível de Substrato

Foram identificados oito gêneros de bactérias redutoras de sulfato : *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* e *Thermodesulfobacterium* (4,14).

Discutiremos com brevidade o complexo sistema enzimático do gênero *Desulfovibrio*, não só por ser aquele para o qual se dispõe de maior número de dados, mas também por neste trabalho se terem isolado e caracterizado hidrogenases apenas de *Desulfovibriones*. Estas bactérias possuem uma enorme variedade de proteínas de transferência eletrônica, contendo uma grande diversidade de grupos protéticos, tais como centros Fe/S, sirohemo, níquel, porfirina de cobalto, hemos c e b, molibdênio e flavinas. Os dados disponíveis para um organismo típico (*D.gigas*) são apresentados na Tabela I.2. As propriedades destas proteínas foram recentemente discutidas em detalhe (5,6,15). As proteínas mais simples contendo apenas um tipo de centro têm sido utilizadas como modelos interessantes para o estudo de enzimas e sistemas enzimáticos complexos que possuem diversos tipos de centros, como por exemplo a hidrogenase (níquel e agregados [Fe-S]), a sulfito reductase (sirohemo e agregados [Fe-S]) e a APS reductase (flavinas e agregados [Fe-S]).

TABELA I.2: Centros activos em proteínas de *D. gigas*

Proteína	Tipo de centro	Potencial redox (mV)
<u>Proteínas hêmicas</u>		
Citocromo c_3 (tetrahêmico)	4 hemos tipo c (his,his)	-235, -235, -306, -315
Citocromo c_3 (octahêmico)	8 hemos tipo c (his,his)	----
<u>Proteínas Fe/S simples</u>		
Rubredoxina [Rb]	Fe(S-cis ₄)	~ 0
Desulforedoxina	[Rb] distorcido	- 30
Ferredoxina I	[4Fe-4S] ^{2+/1+}	- 455
Ferredoxina II	[3Fe-4S]	- 130
<u>Proteínas Fe/S complexas</u>		
Hidrogenase	[3Fe-xS]	- 70
	2 [4Fe-4S] ^{2+/1+}	-220 (a)
	NiS _n X(b)	
Sulfito reductase (Desulfovibrindina)	Sirohemo + [4Fe-4S]	n.d.
APS reductase	n [Fe-S] + Flavina	n.d.
Proteína Mo(Fe/S)	Mo	Mo(VI)/Mo(V): -415
	6 [2Fe-2S] ^{2+/1+}	Mo(V)/Mo(IV): -530
		I-A: -260
		I-B: -440
		II : -285
<u>Outras proteínas</u>		
Flavodoxina	FAD	-150, -450
Proteína de cobalto	Co-porfirina	

(a) Potencial redox ainda não atribuído inequivocamente a um centro

(b) n= 4/6 ; X- ligando azotado ou nitrogenado

Adaptada Ref. (3,6,15)

As enzimas e proteínas envolvidas em reacções de transferência electrônica e na redução dissimilativa de sulfato encontram-se na tabela I.3 agrupadas segundo a sua provável localização (15).

Verifica-se uma grande homologia entre as proteínas de transferência electrônica e as enzimas dos organismos do género *Desulfovibrio*, nomeadamente a presença de citocromo c_3 tetrahêmico, ferredoxinas contendo centros [4Fe-4S]^{2+/1+}, APS reductase e sulfito reductase (apenas *D. baculatus* e *D. desulfuricans* (Norway 4) possuem uma sulfito reductase ligeiramente diferente das isoladas dos outros *Desulfovibriones*).

TABELA I.3: LOCALIZAÇÃO DE ENZIMAS E PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA ELECTRONICA EM *DESULFOVIBRIO*

Enzima	<i>D.gigas</i>	<i>D.vulgaris</i> (Hildenborough)	<i>D.desulfuricans</i> (Norway 4)	Proteína	<i>D.gigas</i>	<i>D.vulgaris</i> (Hildenborough)	<i>D.desulfuricans</i> (Norway 4)
Periplasma				Periplasma			
Hidrogenase	[NiFe]	[Fe]	-	Citocromo c_3 (tetrahêmico)	+	+	?
Ac. fórmico desidrogenase	+	+	+	Citocromo c_{553}	nd	+	nd
Membrana				Membrana			
Hidrogenase	-	-	[NiFe]	Citocromo c_3 (octahêmico)	+	+	+
Fumarato reductase	+	-	nr	Citocromo b	+	nd	+
Nitrito Reductase	+	+	+	Menaquinona (MK6)	+	+	nr
Citoplasma				Citoplasma			
Hidrogenase	?	?	[NiFe]	Citocromo c_3 (octahêmico)	+	+	+
Piruvato desidrogenase	+	+	?	Ferredoxina I	+	-(a)	+
Tiosulfato desidrogenase	+	+	+	Ferredoxina II	+	-(a)	+
Sulfito reductase	DSV	DSV	DSR	Flavodoxina	+	+	nd
APS reductase	+	+	+	Rubredoxina	+	+	+
				Desulforedoxina	+	nd	nd
Localização desconhecida				Localização desconhecida			
Proteína MoFe	+	nd	+	Citocromo $c_{553(550)}$	nd	nd	+
Desidrogenases de				(b)			+(c)
- lactato	+	+	+	Citocromo c_3			
- Ac.málico	+		+				
- Ac.pirúvico			+				
- formato			+				
- fumarato	+						

- ausente; + presente; DSV-desulfovibridina; DSR-desulforubidina
nd- não detectado ; nr- não referido na literatura;

(a) Induzida por crescimento em excesso de ferro
(b) Concentração no periplasma inferior à total
(c) Concentração no periplasma superior à total

I.3-Bactérias Metanogénicas

A biossíntese do metano está limitada a um número restrito de bactérias, as Bactérias Metanogénicas. São procariontes anaeróbicos estritos que pertencem a um grupo de microorganismos designados como *Archaeobacteria*, e que têm como característica comum a formação de metano por redução de CO_2 acoplada à redução de H_2 . São microorganismos bastante antigos do ponto de vista evolutivo e apresentam diversas propriedades distintas: uso de um número restrito de substratos, formando metano como produto final; necessidade de um potencial redox bastante negativo, inferior a -330 mV , para o seu crescimento; coenzimas, RNA e DNA únicos e as paredes e membranas celulares têm uma composição diferente (16-19).

I.3.1-Ciclo biológico do carbono

A metanogénese bacteriana é um processo presente na maioria dos sistemas anaeróbicos, associado à decomposição anaeróbica de matéria orgânica: os organismos metanogénicos actuam na etapa final das cadeias alimentares anaeróbicas. Anualmente são libertados para a atmosfera 500 a 800 milhões de toneladas de metano de origem biológica, correspondendo a 0,5 % da produção total de matéria orgânica por fotossíntese. No entanto, estes valores, embora muito elevados, correspondem apenas a uma pequena parte da produção real pelos metanógenos: o metano, antes de se libertar dos ecossistemas onde é produzido, é consumido em grande parte por organismos metanotrófos, que oxidam o CH_4 a CO_2 , o qual é depois reciclado no ciclo biológico do carbono (Figura I.2). Por outro lado, o metano que consegue atingir a atmosfera, é fotoli-

zado nas suas camadas superiores, retornando á terra na forma de CH_2O , CO e CO_2 , completando assim um importante ciclo terrestre metano / carbono.

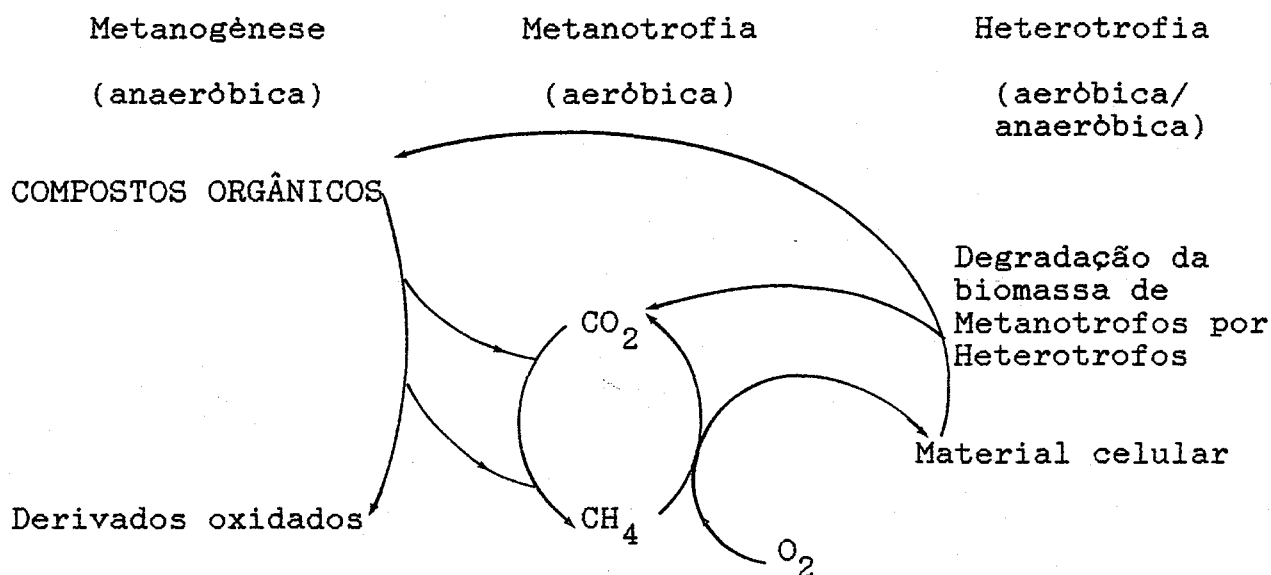


Figura I.2: Ciclo do carbono através de metano na biosfera (19)

As bactérias metanogénicas aparecem em vários tipos de ecossistemas anaeróbicos: sedimentos, pantanos, tundras, lamas de efluentes de digestores, tracto intestinal de animais, principalmente de herbívoros, e fontes geotérmicas.

I.3.2-Proteínas, cofactores e enzimas envolvidas na metanogénese

Os organismos metanogénicos contêm uma série de enzimas e coenzimas únicas envolvidas no caminho de produção de metano (Tabela I.4), nomeadamente corrinóides, pterinas, coenzima M e o cofactor F_{420} , que tem sido apontado como um transportador electrónico central no metabolismo destas bactérias. As propriedades destas proteínas e cofactores foram revistas em detalhe recentemente (17).

TABELA I.4: Coenzimas e proteínas isoladas de Metanogenos (17)

Função	Coenzima / Proteína	Massa Molecular	Organismo
<u>Transferência Electrónica</u>	5-deazaflavina (F ₄₂₀)	843	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Ms.barkeri</i>
	Nicotinamidas	123	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Mc.voltae</i>
	Riboflavina	376	<i>Mb.thermoauto.</i>
	Quinonas (α -tocoferoquinona)	448	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Mb.bryantii</i>
	Citocromo b	-	<i>Ms.barkeri</i>
	Citocromo c	-	<i>Ms.barkeri</i>
	Ferredoxinas		<i>Ms.barkeri</i>
<u>Transferência de carbono</u>	Coenzima M	141	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Ms.barkeri</i>
	Corrinóides	~ 1400	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Ms.barkeri</i>
	Metanopterina	757	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Ms.barkeri</i>
	YFC	~ 725	<i>Mb.thermoauto.</i>
	Metanofurano	564	<i>Mb.thermoauto.</i>
	FAF	~ 700	<i>Mb.thermoauto.</i>
	Biotina	244	<i>Mb.thermoauto.</i>
	Acido fólico	443	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Mc.voltae</i>
	Tiamina	337	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Mc.voltae</i>
	Acido pantoténico	219	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Mc.voltae</i>
<u>Função desconhecida</u>	F ₄₃₀	977	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Ms.barkeri</i>
	Componente B	~ 1000	<i>Mb.thermoauto.</i> <i>Ms.barkeri</i>

YFC- "Yellow fluorescent factor";

FAF- "Formaldehyde activation factor";

O seu papel na metanogénese encontra-se esquematizado na figura I.3, onde se realça o papel central do cofactor F₄₂₀.

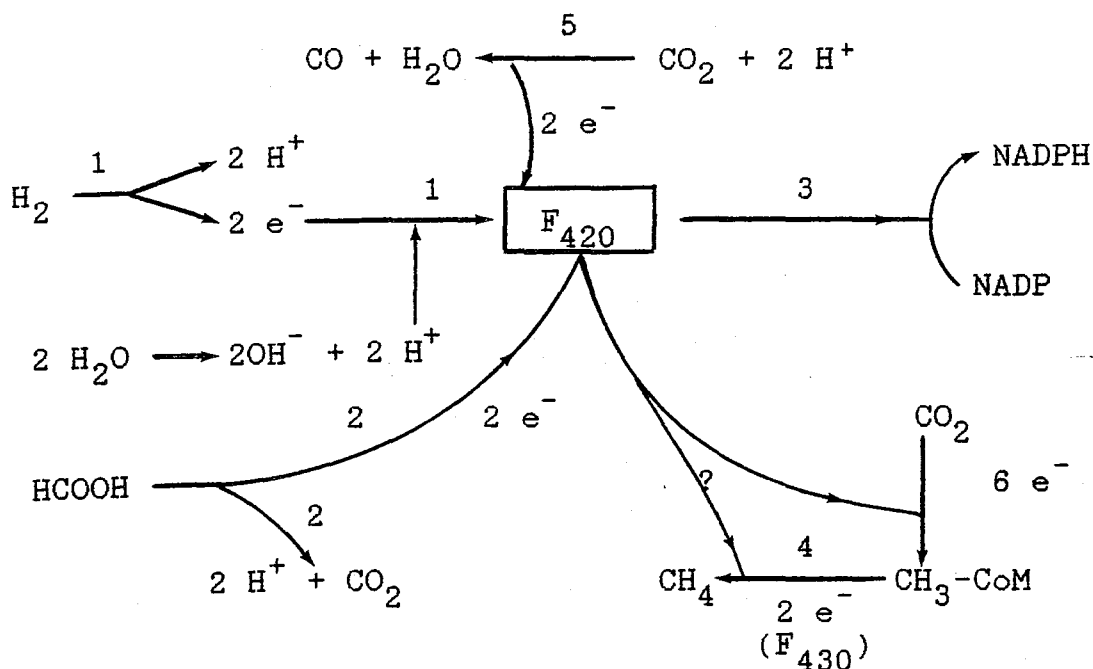


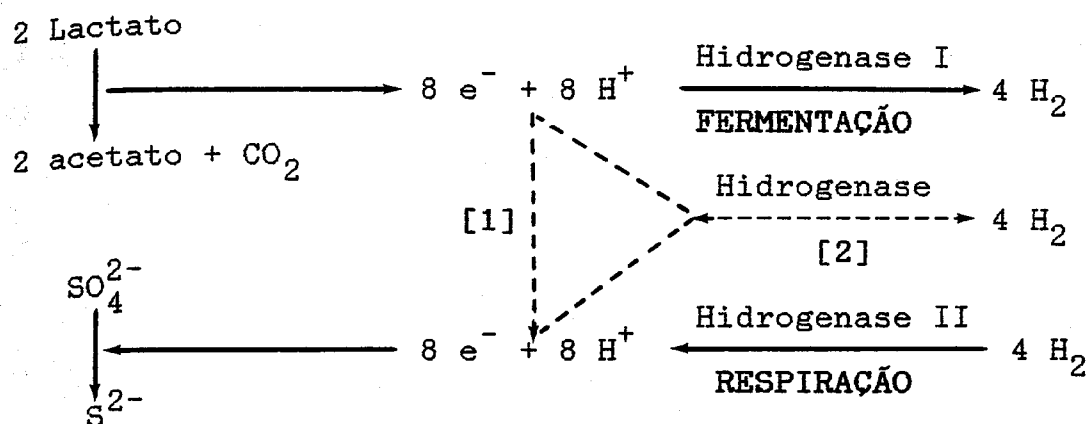
Figura I.3: Reações de transferência eletrônica na metanogênese
 1-Hidrogenase
 2-Formato desidrogenase
 3-NADP-F₄₂₀ oxidoreductase
 4-Reductase da metil CoM
 5-CO desidrogenase (17)

I.4-Papel da hidrogenase na bioenergética das bactérias redutoras de sulfato e metanogênicas

Como referido no início deste capítulo a enzima hidrogenase pode actuar como geradora de um gradiente de protões, efectuando a sua translocação, uma propriedade que pode ser determinante para a bioenergética destes organismos. Nas alíneas seguintes será analisado brevemente este papel da enzima hidrogenase em bactérias redutoras de sulfato e metanogênicas.

I.4.1-Bactérias redutoras de sulfato (3,4,6,15)

As duas reacções básicas das bactérias redutoras de sulfato crescendo no meio de lactato/sulfato são as seguintes (15).



Na ausência de sulfato estas bactérias comportam-se como organismos fermentativos, obtendo energia por ATP produzido através de fosforilação a nível de substrato; o crescimento nestas condições é termodinamicamente desfavorável mas, na presença de bactérias metanogénicas, que utilizam eficientemente o hidrogénio produzido pelos redutores de sulfato (Transferência de Hidrogénio Inter-espécies) para a redução de CO₂ a metano, o processo global torna-se energeticamente favorável. Na presença de lactato/sulfato, estas bactérias comportam-se como organismos "respiratórios", em que a redução de sulfato é comparável à respiração de oxigénio por organismos aeróbicos.

A enzima hidrogenase desempenha um papel chave nestas reacções, embora diversas questões estejam ainda por esclarecer:

- a necessidade da presença de duas hidrogenases (linhas a cheio), ou de apenas uma hidrogenase (linha a tracejado) não está ainda definida;
- o fluxo electrónico entre a oxidação de lactato e piruvato e a redução de sulfato poderá fazer-se directamente [1] ou através da hidrogenase [2];

Vários dados experimentais obtidos em organismos redutores

de sulfato apontam para a síntese de ATP acoplada à transferência electrónica, por sua vez acoplada à oxidação de hidrogénio e à oxidação anaeróbica de substratos orgânicos.

Dados obtidos para diversos organismos sugerem que a oxidação periplásmica de H_2 gera um gradiente de protões e a síntese de ATP através de uma ATPase. Dois mecanismos foram propostos para a formação deste gradiente de protões em *Desulfovibrio*:

- transferência electrónica vectorial acoplada à oxidação de hidrogénio pela hidrogenase na superfície externa da membrana citoplásmica;
- translocação de protões acoplada à redução de substratos, através de um ciclo de Mitchell típico.

Mecanismo de acoplamento

Foi proposto um ciclo quimiostático de hidrogénio, envolvendo a reciclagem desta molécula, como o mecanismo pelo qual as espécies *Desulfovibrio* produzem o ATP necessário para o crescimento em lactato e sulfato (5,6,15). Este esquema (Fig I.4) envolve a formação de hidrogénio molecular, uma espécie com alta permeabilidade, no citoplasma a partir de lactato e piruvato e a sua rápida difusão através da membrana citoplásmica. Na superfície externa da membrana H_2 é oxidado a H^+ pela hidrogenase periplásmica, o que parece requerer a presença de citocromos c_3 tetrahémico, e os electrões resultantes desta oxidação são transferidos através da membrana em sentido inverso, deixando os protões na superfície externa da membrana.

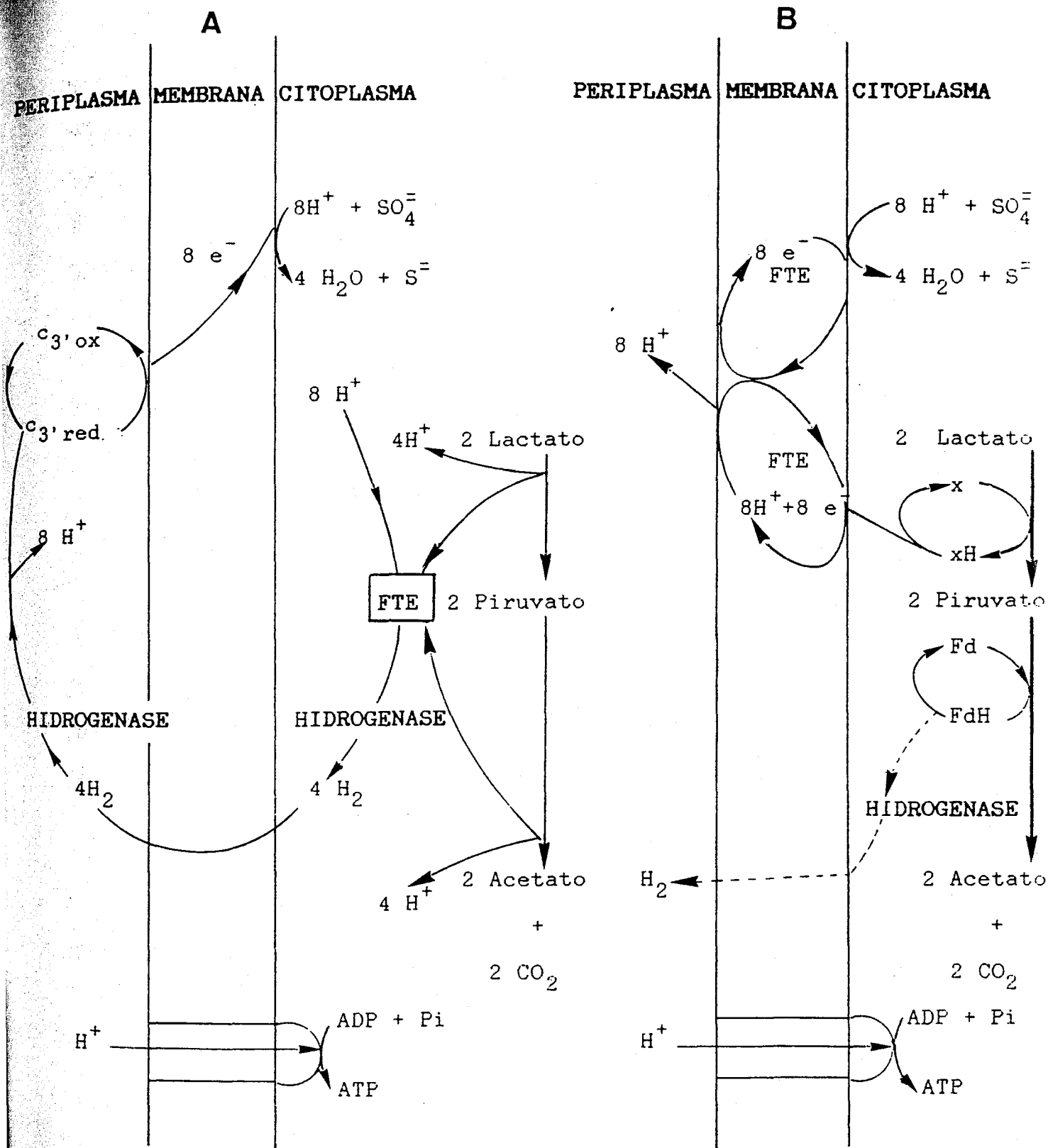


Figura I.4: Ciclos de reciclagem de hidrogénio (A) e de transformação de traços de hidrogénio (B) (15)
FTE- Fosforilação por Transferência Electrónica

Os electrões são então utilizados no citoplasma para a redução de sulfato a sulfureto, resultando no consumo estequiométrico de 8 protões. O balanço efectivo é a transferência de oito protões através da membrana citoplásmica, não envolvendo um ciclo de Mitchell típico. O gradiente protónico pode então gerar a síntese de ATP pelo modo convencional através de uma ATPase.

Diversas evidências experimentais têm permitido suportar este esquema, em particular estudos de localização enzimática, a rápida produção de protões acoplada à oxidação de H_2 com sulfito, bem como a restauração de oxidação de sulfato acoplada à redução de sulfito em esferoplastos de *D. gigas* por adição de hidrogenase e citocromo c_3 puros.

O esquema pode ser também utilizado para compreender a produção de H_2 durante o crescimento em lactato e sulfato, e a capacidade de os *Desulfovibrio* funcionarem como produtores ou utilizadores de H_2 em associações microbianas envolvendo a Transferência de Hidrogénio Inter-espécies.

O esquema de reciclagem de H_2 requer processos de transferência electrónica vectorial para a separação de cargas; outro esquema foi proposto, envolvendo conservação de energia através de um ciclo de Mitchell típico.

Dois requisitos são fundamentais para a hipótese de reciclagem de hidrogénio. i) Presença de duas hidrogenases, uma interna e outra externa; embora em alguns organismos tenham sido já isoladas hidrogenases membranares e internas, a clarificação inequívoca deste ponto é necessária para provar este mecanismo. ii) Separação dos processos de transferência electrónica, impedindo que os electrões provenientes da oxidação dos substratos

orgânicos e que levam à produção de hidrogénio no citoplasma sejam utilizados pelas enzimas redutoras de sulfato. Esta separação pode ser conseguida por dois processos complementares: compartimentalização das proteínas e especificidade de transferência electrónica.

O citocromo c_3 tetrahémico tem sido apontado como um cofactor necessário para a redução pela hidrogenase de outros aceitantes electrónicos, como as flavodoxinas, ferredoxinas, e rubredoxinas. No entanto, estudos recentes têm mostrado que alguns destes transportadores são reduzidos directamente pela hidrogenase, na presença de hidrogénio, revelando uma certa não especificidade desta enzima. Assim, o papel do citocromo c_3 poderá estar relacionado com outros factores, sendo no entanto de realçar algumas características deste citocromo que o tornam "um bom candidato" para o aceitante fisiológico da hidrogenase, pelo menos em *D. gigas* (20): tanto este citocromo como a hidrogenase de *D. gigas* contêm quatro grupos redox, sendo os potenciais redox dos hemos e de algumas transições redox detectadas para esta hidrogenase dependentes do pH. Esta característica permite um ajuste fino do potencial redox dos centros activos destas proteínas, que pode levar a uma optimização dos processos de transferência electrónica entre estas proteínas. Por outro lado, os potenciais redox dos hemos do citocromo c_3 são próximos dos potenciais redox medidos para alguns processos redox na hidrogenase, exactamente aqueles que têm sido associados à actividade catalítica desta enzima (~ -220 e ~ -350 mV, ver Capítulo V).

Por outro lado, os dados disponíveis não permitem uma generalização para todos os *Desulfovibrio*. Para além de alguma

diversidade das enzimas isoladas de cada estirpe e dos substratos utilizados por cada uma, verifica-se também que os produtos finais de oxidação variam conforme o organismo .

O outro esquema referido (Figura I.4-B), utilizando um ciclo de Mitchell típico, envolve a transformação de traços de hidrogénio, produzidos no citoplasma. A produção de hidrogénio permitiria controlar o estado de oxidação dos transportadores electrónicos internos, ligados à conservação de energia. Pelo contrário, o consumo de H_2 serviria para impedir a perda de energia sob a forma de hidrogénio.

I.4.2-Bactérias metanogénicas (17)

Para os organismos metanogénicos dispõe-se de um menor número de dados para a compreensão da sua bioenergética, pelo que os esquemas que têm sido propostos são ainda bastantes hipotéticos. Assim, serão referidos apenas alguns aspectos genéricos em relação ao papel da hidrogenase nestes organismos.

A redução de CO_2 ou outro substrato metanogénico é semelhante à redução de SO_4^{2-} , NO_3^- e O_2 , nos processos de respiração aeróbica ou anaeróbica. Os dados existentes, resultando essencialmente de estudos de medidas de gradientes de potencial electroquímico e de pH, envolvendo o uso de inibidores da metanogénese e protonóforos, sugerem que as bactérias metanogénicas produzem ATP por um mecanismo quimioestático. As reacções exergónicas da metanogénese fornecem a energia necessária para esta síntese e criam um fluxo de prótons que gera a formação de ATP. A metanogénese estará associada à fosforilação por transferência electrónica e à síntese de ATP. A localização membranar de vários

dos cofactores da metanogênese sugerem também a existência de mecanismos de conversão de energia por transferência electrónica vectorial. Contudo, não é ainda possível excluir completamente a existência de fosforilação a nível de substrato, que tem sido sugerida por alguns autores (21).

Todas as bactérias metanogénicas até agora estudadas contêm pelo menos uma hidrogenase. Em alguns organismos, têm sido isoladas duas hidrogenases distintas: uma, que contém grupos flavínicos e reduz o cofactor F_{420} , e outra não contendo aqueles grupos e não revelando actividade na redução deste cofactor (ver Capítulo VIII), o que sugere um papel relevante para a hidrogenase nos processos de transferência electrónica.

Em termos simples, o processo de síntese de ATP acoplado à metanogênese pode ser traduzido pelo esquema da figura I.5.

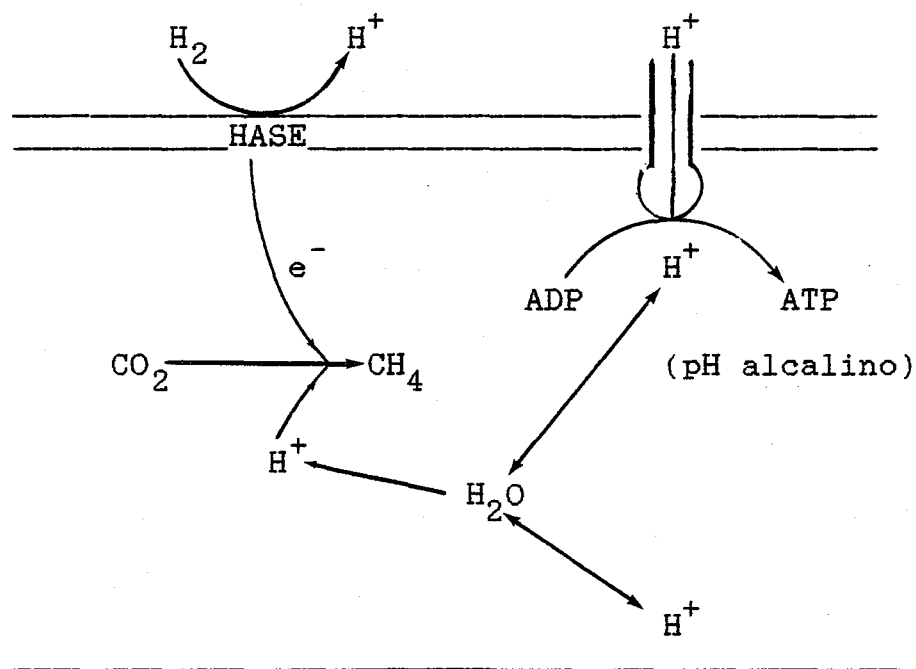


Figura I.5: Esquema da síntese de ATP acoplada à metanogênese a partir de CO_2 e H_2 (17)

O hidrogénio actua como fonte de electrões para a redução de unidades C_1 (CO_2) a metano . Ocorre então uma separação de cargas na membrana, acoplada á formação de ATP e, como resultado, a produção de metano serve para remoção de electrões e protões do sistema. A hidrogenase desempenha aqui um papel primordial pois além de fornecer, por oxidação de hidrogénio, os electrões para as reacções de transferência electrónica, actua como bomba primária de protões, criando um gradiente de pH.

A CO desidrogenase poderá também estar envolvida na formação do gradiente de protões, particularmente quando as bactérias usam acetato como substrato. Outros modelos têm sido considerados, envolvendo hidrogenases internas, que produziriam H_2 , e uma hidrogenase membranar, que oxidaria o hidrogénio formado no citoplasma e criaria o gradiente de protões, como tem sido sugerido para as bactérias redutoras de sulfato. A presença de duas hidrogenases distintas em diversas bactérias metanogénicas é compatível com esta hipótese.

I.5-Interacções microbianas- Transferência de hidrogénio Interespécies (3,22)

Em vários ecossistemas, o metabolismo do lactato por bactérias redutoras de sulfato nas camadas superiores de sedimentos fornece a principal fonte de energia para os organismos metanogénicos fermentativos de acetato. Os metanogenos funcionam como "poços de electrões", substituindo o sulfato, permitindo assim o catabolismo de lactato por redutores de sulfato e alterando o fluxo de electrões nestes últimos organismos na direcção da produção de hidrogénio. Por exemplo, em culturas mistas de orga-

nismos metanogénicos e redutores de sulfato em etanol, verifica-se uma interacção simbiótica entre estes dois tipos de organismos: os primeiros favorecem o metabolismo dos segundos, deslocando o equilíbrio desfavorável causado pelas altas concentrações de hidrogénio. Do ponto de vista termodinâmico, o crescimento de redutores de sulfato em etanol e na ausência de sulfato é desfavorável (Tabela I.6); a presença de metanogenos torna o processo global termodinamicamente favorável (Figura I.6).

TABELA I.5: Energias livres para oxidação de etanol e formação de metano (3)

Reacção	G'_0 (Kcal)
A : $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2 \text{H}_2$	+ 1,5
B : $4 \text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	- 33,2
A + B	- 31,7

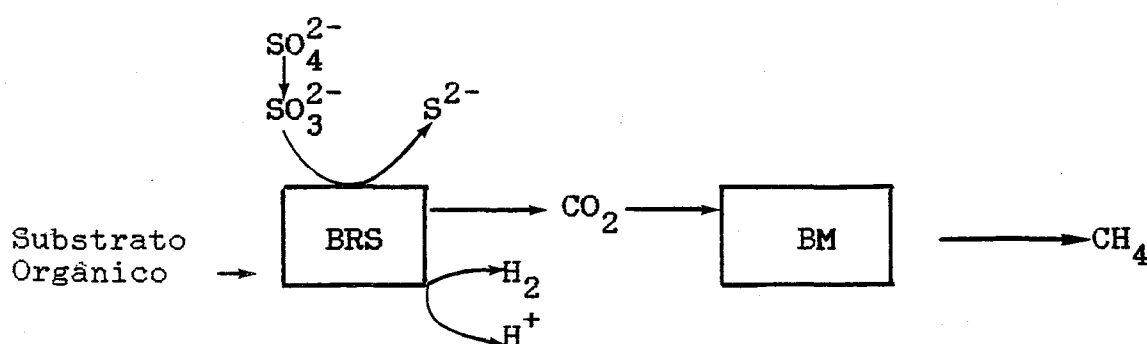


Figura I.6: Transferência de hidrogénio interespecífica
 BRS- Bactérias redutoras de sulfato
 BM- bactérias metanogénicas

Esta interacção traduz a Transferência de Hidrogénio Inter-específica. As associações simbióticas deste tipo são importantes do ponto de vista ecológico, resultando num aumento da utili-

zação de substratos, da síntese de ATP pelos não metanógenos e no aumento do crescimento de ambos os organismos. Verifica-se também que nos nichos ecológicos em que estas associações são operantes a concentração extracelular de hidrogénio é muito baixa, o que indica que a Transferência de Hidrogénio Inter-espécies é muito efectiva. Estes processos revelam também o papel fundamental da hidrogenase nestes organismos.

I.6-Relevância económica e ecológica das bactérias redutoras de sulfato e metanogénicas

As bactérias redutoras de sulfato e metanogénicas estão envolvidas em diversos processos de interesse económico, tanto benéficos (produção de energia, produção de biomassa e outros) como prejudiciais (corrosão, poluição). Estes efeitos serão descritos sumariamente.

I.6.1-Bactérias redutoras de sulfato (23-25)

A acção das bactérias redutoras de sulfato está associada fundamentalmente à produção de H_2S através da redução dissimilativa de sulfato em meios anaeróbicos. Este ácido, para além de ser tóxico para os organismos aeróbicos é fortemente corrosivo para metais. Em meios aquáticos em que a entrada de matéria orgânica ultrapassa a sua capacidade de autoregeneração, o aumento da carência bioquímica de oxigénio (BOD) pode tornar os meios anaeróbicos. Esta situação é frequente em canais, rios, estuários, lagoas e águas estagnadas que recebem os efluentes de centros populacionais vizinhos. Em geral estas águas contêm concentrações elevadas de sulfato, o que leva à formação de ácido

sulfídrico. Estas condições autoperpetuam-se, pois as propriedades redutoras de H_2S estabilizam o meio anaeróbico naqueles nichos ecológicos e o seu efeito nocivo nos organismos aeróbicos, como os peixes, aumenta o fornecimento de nutrientes para estas bactérias. A única solução para evitar este tipo de poluição é diminuir a entrada de matéria orgânica nestes ecossistemas. Outros efeitos que têm sido referidos são a conversão de fosfato férrico em sulfureto de ferro, que precipita, libertando-se o ião fosfato que leva a um aumento de produção de biomassa, e a remoção excessiva do ião sulfato, que pode causar uma diminuição da produção de biomassa.

O meio criado pelas bactérias redutoras de sulfato favorece o crescimento de outras bactérias do ciclo do enxofre, conduzindo ao aparecimento de bactérias oxidantes de enxofre, como *Chromatium*. Ocorre então a formação do que vulgarmente se designa por "mar de sangue" devido ao florescimento daquelas bactérias, de cor vermelha. Tem sido referida também a contaminação de solos e areias em zonas anaeróbicas por formação de FeS devido à acção destas bactérias. As bactérias sulfato redutoras aparecem ainda frequentemente associadas à corrosão anaeróbica de metais ferrosos.

As bactérias redutoras de sulfato podem ser utilizadas em tratamento de efluentes que servem de substratos para certas bactérias (por exemplo, na indústria de pasta de papel), ou para a remoção de ferro de águas ferruginosas. Em qualquer dos casos, o rendimento, do ponto de vista económico, depende da possível utilização industrial do subproduto H_2S .

I.6.2-Bactérias metanogénicas (22,26)

O interesse económico das bactérias metanogénicas reside fundamentalmente no produto final do metabolismo destes organismos - Metano. Este gás é actualmente utilizado como combustível, representando, por exemplo nos Estados Unidos, 26% das fontes de energia (dados de 1981), dos quais apenas 0,08% são de origem biológica. Em relação aos combustíveis tradicionais derivados do carvão e do petróleo, o metano apresenta algumas vantagens, não só por ter um poder calorífico superior, mas também por os problemas de poluição devidos à sua combustão serem bastante menores.

A actividade biogénica de produção de metano excede a produção geológica: 65% do metano produzido na Terra é de origem microbiana. A utilização de bactérias metanogénicas para a produção daquele gás pode, pois, contribuir para a criação de alternativas energéticas válidas.

Outra aplicação possível para estas bactérias é a sua utilização em culturas bacterianas mistas, como processo de reduzir problemas de poluição, como por exemplo a eliminação de dejectos orgânicos.

Os efluentes contendo matéria orgânica podem ser tratados por digestão anaeróbica, produzindo metano. Estes sistemas têm algumas vantagens em relação à digestão aeróbica, nomeadamente por estabilização da lama de efluentes, baixa produção de biomassa microbiana, resultando numa maior facilidade de tratamento dos efluentes finais, baixa necessidade de nutrientes, não necessita de oxigénio, simplificando-se assim as instalações de digestão e, finalmente, por levar à produção de metano.

Vários tipos de dejectos têm sido tratados deste modo, nomeadamente dejectos municipais, estrume, esgotos e efluentes industriais. A utilização generalizada deste processo tem sido limitada essencialmente pelos elevados custos de capital e por o preço comercial do metano assim produzido não ser concorrencial com os preços do gás natural. Contudo, atendendo à produção de um combustível, o metano, e de subprodutos que podem por vezes ser usados como fertilizantes ou rações alimentares, a digestão anaeróbica é certamente um processo vantajoso em numerosas situações envolvendo controlo de poluição e em processos de produção de pequena escala, nos quais a energia produzida é consumida localmente. Esta última situação é, talvez, aquela em que este tipo de digestão tem sido mais utilizado.

I.7-Aplicações biotecnológicas da enzima hidrogenase (27-30)

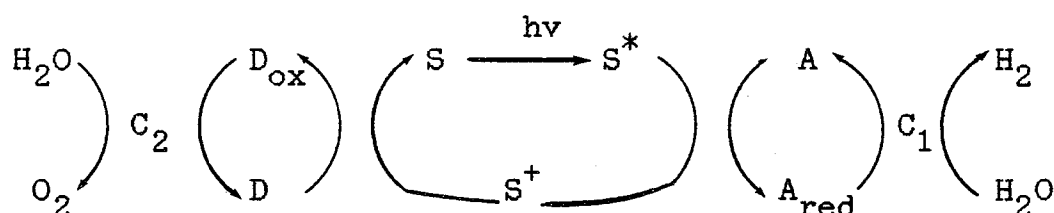
A enzima hidrogenase tem sido utilizada em processos de interesse biotecnológico, que podem dividir-se essencialmente em dois grupos:

- i) Produção de hidrogénio, em geral por fotólise da água, usando sistemas biológicos ou artificiais;
- ii) Uso de hidrogénio como redutor em reacções de síntese química (síntese de produtos de química fina).

Outra utilização possível no futuro, quando forem conhecidas detalhadamente a constituição e propriedades catalíticas dos centros activos desta enzima complexa, é a síntese de sistemas biomiméticos, particularmente activos em reacções que envolvam a activação da molécula de hidrogénio, que poderão substituir efi-

cientemente a hidrogenase nas suas aplicações biotecnológicas. Esta síntese de sistemas modelo envolverá, possivelmente, a síntese de compostos heteronucleares de níquel em conjugação com agregados Fe/S.

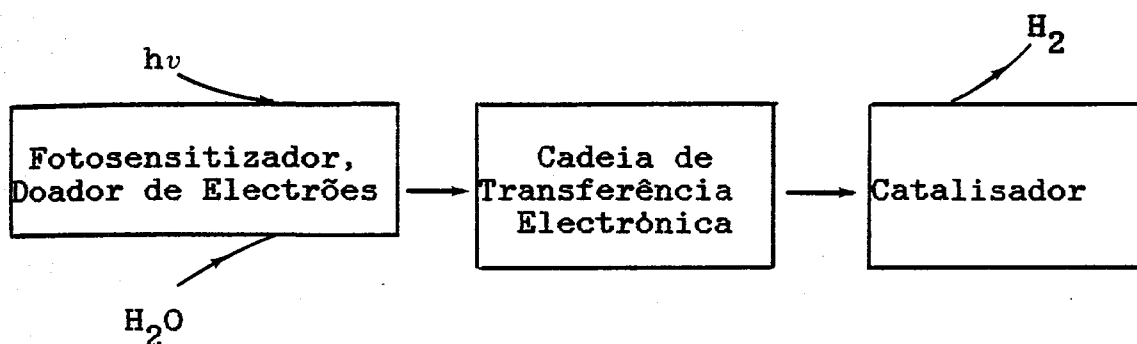
A crise de energia desde 1973 levantou o problema do uso de combustíveis fósseis, não só devido ao aumento brusco do preço de derivados do petróleo, mas também porque as reservas de petróleo são limitadas, para além dos problemas de poluição atmosférica resultantes da sua combustão. Foi, por isso, necessário encarar fontes alternativas de energia, nomeadamente a energia solar. Um dos sistemas que tem sido ensaiado para o aproveitamento desta forma de energia é a fotodecomposição da água em hidrogénio e oxigénio. O sistema básico para realizar esta transformação é, esquematicamente, o seguinte:



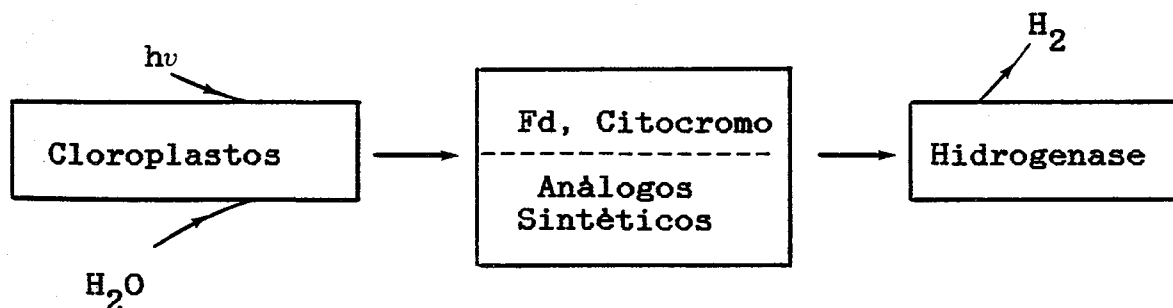
O sistema é constituído por um fotosensibilizante, S, que reage no estado fotoexcitado com um aceitante de electrões, A, e é regenerado por um doador de electrões D. O aceitante reduzido, através de uma cadeia de transferência electrónica e de um catalisador (C1) apropriados leva à redução da água, com formação de hidrogénio; pelo contrário, o doador de electrões conduz à oxidação deste substrato. O sistema é, teoricamente, auto regenerável, utilizando como único substrato a água e como fonte de energia a

luz solar. Têm sido utilizados sistemas deste tipo constituídos por unidades inteiramente artificiais, ou por unidades biológicas (Figura I.7). Nestes últimos sistemas utilizam-se cloroplastos como centro fotosensibilizador e oxidante da água, enquanto a redução da água é realizada pela enzima hidrogenase.

i) COMPONENTES PRINCIPAIS



ii) UNIDADES BIOLÓGICAS



iii) UNIDADES SINTÉTICAS

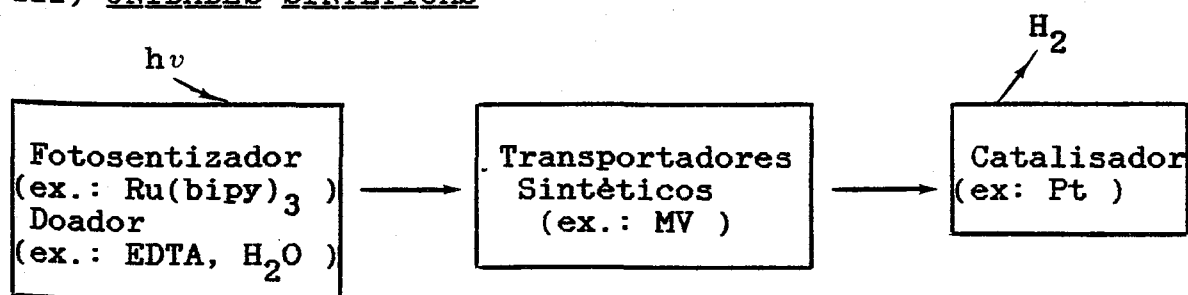


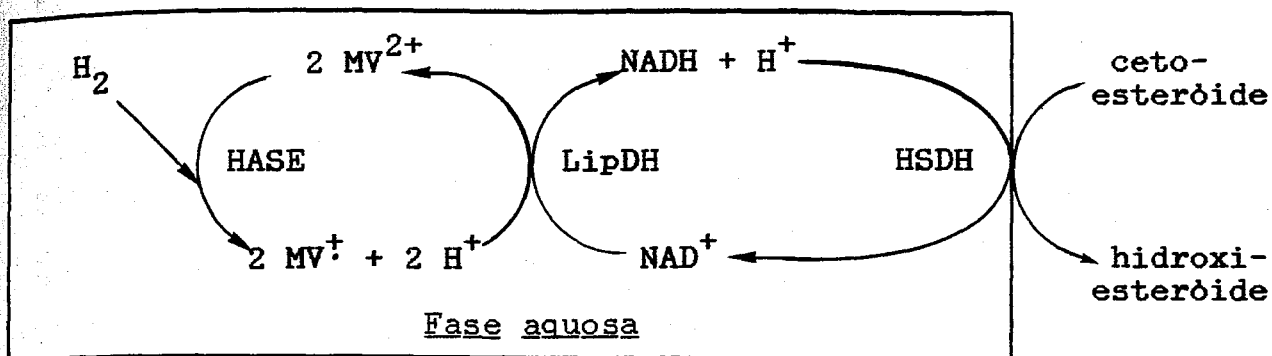
Figura I.7: Sistemas utilizados na fotólise da água
MV- metil viologênio; Fd- Ferredoxina

Um dos principais problemas destes sistemas, que geralmente são estáveis apenas durante algumas horas, reside na inibição da hidrogenase pelo oxigénio ou na oxidação dos transportadores de carga de baixo potencial, pelo que têm sido ensaiados sistemas em que se efectua uma compartimentalização de cada unidade, através de micelas e vesículos ou mesmo em sistemas electroquímicos, ou ainda a imobilização da enzima hidrogenase. Nestes sistemas tem-se verificado um aumento da estabilidade e reactividade da hidrogenase.

A biofotólise da água apresenta contudo diversas vantagens. O substrato é abundante e barato, para além de ser regenerado por utilização do combustível produzido, o hidrogénio, que é um combustível, sob diversos aspectos, ideal (poder calorífico elevado, não poluente).

A outra aplicação biotecnológica referida para a enzima hidrogenase, apenas utilizada recentemente (28) consiste no uso de sistemas enzimáticos para a síntese de produtos de química fina. Nestes sistemas o hidrogénio, através da enzima hidrogenase, serve como fonte de electrões. Um exemplo deste processo (Figura I.8) é a síntese de 20-hidroxi-progen-3-en-4-ose (R_2CHOH) a partir da progesterona, utilizando-se a 20-hidroxiesteróide desidrogenase (HSDH), a enzima que realiza a redução da progesterona, e a lipoamido desidrogenase (LipDH) que actua como intermediária, convertendo NAD^+ em NADH, e a hidrogenase de *D. vulgaris* (Hildenborough) como redutora (27). Utiliza-se ainda um sistema micelar que permite a compartimentalização das enzimas numa fase aquosa, enquanto os reagentes e produtos se mantêm na fase exterior, orgânica, diminuindo os problemas de inibição enzimática

pelo substrato ou produto, e permitindo um contacto óptimo entre as enzimas envolvidas.



Fase Orgânica

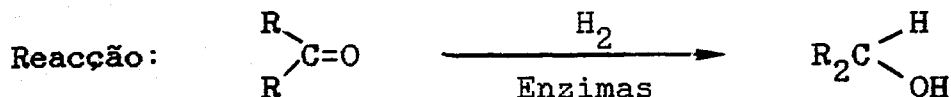


Figura I.8: Produção de compostos de química fina por sistemas enzimáticos ()
 R_2CO : progesterona; HASE-hidrogenase
 LipDH- lipoamido desidrogenase
 HSDH- 20 -hidroxi esteróide desidrogenase
 MV-metilviologénio

I.8-Referências

- 1) H.G.Schlegel and K.Schneider, (1978), in "Hydrogenases: Their catalytic Activity, Structure and Function", ed. H.G.Schlegel and K.Schneider, Erich Goltze, Göttingen, pp. 15-44
- 2) M.W.W.Adams, L.E.Mortenson and J.S.Chen, (1981), Biochim. Biophys.Acta, 594, 105-176
- 3) J.LeGall, J.J.G.Moura, H.D.Peck, Jr. and A.V.Xavier, (1982), in "Iron-Sulfur Proteins", ed. T.G.Spiro, John Wiley and Sons, N.Y., pp. 177-245
- 4) H.D.Peck, Jr. and J.LeGall, (1982), in "Sulfur Bacteria", ed. J.R.Postgate and D.P.Kelly, Royal Society, London, pp. 13-36

- 5) J.M.Odom and H.D.Peck, Jr., (1981), FEMS Letters, 12, 47-53
- 6) J.M.Odom and H.D.Peck, Jr., (1984), Ann.Rev.Microbiol., 38, 555-592
- 7) B.H.Huynh, M.Czechowski, H.J.Kruger, D.V.DerVartanian, H.D.Peck, Jr. and J.LeGall, (1984), Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81, 3748-3732
- 8) G.Wang, M.J.Benecky, B.H.Huynh, J.F.Cline, M.W.W.Adams, L.E.Mortenson, B.H.Hoffman and E.Münck, (1984), J.Biol.Chem., 259, 14328-14331
- 9) H.M. van der Westen, S.G.Mayhew and C.Veeger, (1978), FEBS Lett., 86, 122-126
- 10) M.W.W.Adams and L.E.Mortenson, (1984), Biochim.Biophys.Acta, 766, 51-61
- 11) M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, D.V.DerVartanian, J.LeGall, H.D.Peck, Jr., B.H.Huynh and J.J.G.Moura, (1983), Eur.J.Biochem., 130, 481-484
- 12) M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, B.H.Huynh, D.V.DerVartanian, H.D.Peck, Jr., J.LeGall and J.J.G.Moura, (1985), J.Biol.Chem., 260, 8942-8950
- 13) J.A.Cchiff and H.Frankhauser, (1981), in "Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur", ed. H.Bothe and A.Trebst, Springer-Verlag, pp. 154-168
- 14) R.K.Thauer and W.Badziong, (1981), in "Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur", ed. H.Bothe and A.Trebst, Springer-Verlag, pp. 168-198
- 15) J.LeGall and G.Fauque, (1986), in "Environmental Microbiology of Anaerobes", ed. A.J.B.Zehnder, em impressão
- 16) L.Daniels, G.Fuchs, R.K.Thauer and J.G.Zeikus, (1977), J.

Bacter., 132, 118-126

17) L.Daniels, R.Sparling and G.D.Sprott, (1984), Biochim. Biophys.Acta, 768, 113-163

18) G.Fauque, (1985), These de Doctorat, Univ.Compiègne, France

19) P.S.Wolfe and I.J.Higgins, (1979), Microb.Biochem., 21, 267-353

20) H.Santos, J.J.G.Moura, I.Moura, J.LeGall and A.V.Xavier, (1984), Eur.J.Biochem., 141, 283-298

21) J.R.Lancaster, Jr., S.W.Carper, B.P.Crider, K.Gillies and R.K.Rogers, (1985), in "Frontiers in Bioinorganic Chemistry", Ed. A.V.XAVIER, VCH, pp. 27-35

22) J.G.Zeikus, (1977), Bact.Rev., 47, 514-541

23) J.R.Postgate, (1979), "The Sulphate reducing Bacteria", Cambridge University press, Cambridge

24) B.Jorgensen, (1981), in "Sulfur Bacteria", ed. J.R.Postgate and P.D.Kelly, Royal Society, London, pp. 113-131

25) J.R.Postgate, (1981), in "Sulfur Bacteria", ed. J.R.Postgate and P.D.Kelly, Royal Society, London, pp. 153-170

26) L.Daniels, (1984), Trends in Biotechnology, 2, 91-98

27) I.Okura, (1986), Biochimie, 68, 189-199

28) R.Hilhorst, C.Laane and C.Veeger, (1983), FEBS Lett., 159, 225-228

29) T.Yagi, (1977), in "Biological Solar Energy Conversion", ed. A.Matsui, S.Miyachi, A.SanPietro and S.Tamura, Academic Press, N.Y., pp. 61-68

30) K.K.Rao, L.Rosa and D.O.Hall, (1976), Biochim.Biophys.Acta, 68, 21-28

CAPITULO II:

PROPRIEDADES GERAIS DO NIQUEL:

Sua relevância em sistemas biológicos

II.1-Níquel em sistemas biológicos

Ao contrário de outros metais de transição, como o ferro, o cobalto e o cobre, que há já muitos anos são reconhecidos como essenciais a um grande número de funções metabólicas, apenas recentemente se começou a considerar o níquel como um micronutriente fundamental para a maioria dos organismos. Contudo, para além da enzima hidrogenase em diversos microorganismos, apenas em três casos concretos foi demonstrada, durante a última década, a sua presença em metaloproteínas: urease (plantas ureolíticas), CO desidrogenase (bactérias acetogénicas) e cofactor F_{430} (bactérias metanogénicas) (Tabela II.1) (1-20). As características da hidrogenase serão analisadas em detalhe em capítulos posteriores, pelo que nas alíneas que se seguem serão apresentadas em linhas gerais as propriedades básicas das outras enzimas contendo níquel.

II.1.1-Urease (3-7)

A enzima urease, presente em organismos ureolíticos e plantas crescendo em meios em que a ureia é a única fonte de azoto, catalisa a reacção de hidrólise da ureia



A urease foi a primeira metaloenzima na qual se detectou a presença de níquel, demonstrando-se não só que a sua actividade era dependente da concentração de níquel no meio de crescimento daqueles organismos mas também que este metal estava presente na enzima urease isolada a partir de feijão macaco ("jack bean", *Canavalia ensiformis*). A urease desta planta contém 12 átomos de níquel por mole (2 átomos por subunidade) no estado de oxidação

TABELA II.1^(a):
Níquel em sistemas biológicos

Organismo	Função
Animais	Crescimento Síntese e/ou actividade enzimática Estrutura e função de membranas
Plantas	Crescimento em ureia como fonte de azoto Constituinte de Urease
Bactérias Rumen	Síntese de urease
Bactérias Knallgas	Crescimento em H ₂ e O ₂ Síntese de Hidrogenase
<i>Oscillatoria</i> sp.	Crescimento
<i>C.pasteurianum</i>	Constituinte de CO desidrogenase
Bactérias Acetogénicas	Constituinte de CO desidrogenase
Bactérias Metanogénicas	Crescimento Constituinte de F ₄₃₀ e hidrogenase
Bactérias anaeróbicas (redutoras de sulfato, fermentativas)	Constituinte de hidrogenases
Bactérias aeróbicas	Crescimento
Algas	Actividade hidrogenase

(a) Adaptada das refs. (1-4)

Ni(II) , silencioso em RPE. Estudos de EXAFS, utilizando compostos modelo de níquel com polipeptidos coordenados por átomos de azoto, indicaram que o níquel nesta enzima está possivelmente coordenado por átomos de azoto de resíduos histidina (6).

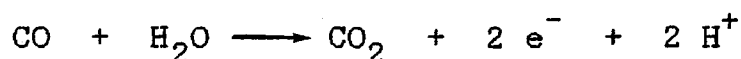
Alguns autores postularam a mudança do estado de oxidação do níquel durante o ciclo catalítico desta enzima, embora não

existam ainda evidências experimentais que permitam comprovar esta hipótese (7).

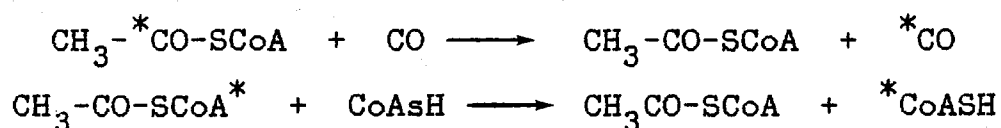
A função da enzima urease não se encontra ainda perfeitamente estabelecida pois, para além da hidrólise da ureia, diversos autores (4,5) têm postulado o seu envolvimento em percursos anabólicos de utilização de compostos azotados como arginina, guanidina e ureídios, parecendo ser essencial para o metabolismo do azoto.

II.1.2-CO desidrogenase (8-12)

Esta enzima catalisa a oxidação de CO a CO₂ ou a reacção inversa de redução de CO₂ a CO:



E também o componente central da síntese de acetil coenzima A e catalisa a permuta entre CO e o grupo carbonilo de acetil CoA e entre CoA e o residuo CoA de acetil CoA:



Estudos nutricionais, substituição isotópica com ⁶¹Ni e ⁶³Ni e análise química mostraram que as CO desidrogenases de *Clostridium thermoaceticum*, *C.formicoaceticum*, *C.pasteurianum* e *Acetobacterium woodii* contêm níquel (8-11). As CO desidrogenases de organismos acetogénicos são hexâmeros (α₃β₃) que contêm dois átomos de níquel por dímero. No estado oxidado a enzima isolada de *C.thermoaceticum* apresenta um espectro de RPE rômboico com valores de g a 2,21 , 2,11 e 2,02 , detectável a 77 K (Fig. II.1) (8,9).

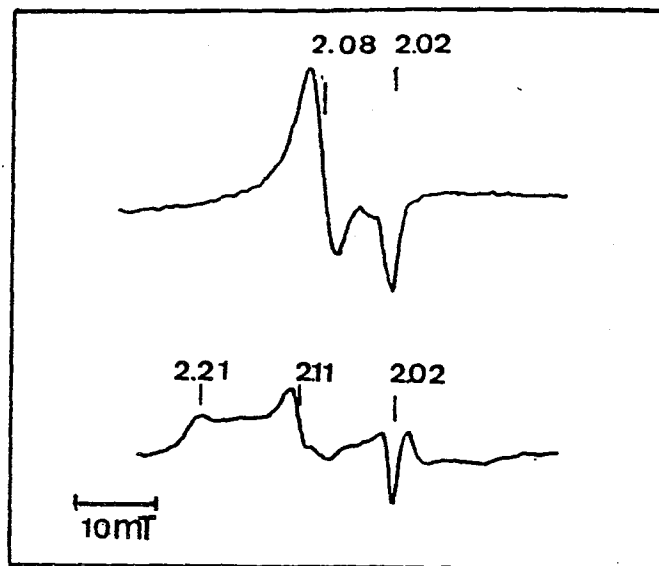


Figura II.1: Sinais de RPE de CO desidrogenase de *C. thermoaceticum* a 77 K
A) Sob CO (9)
B) Oxidada (8)

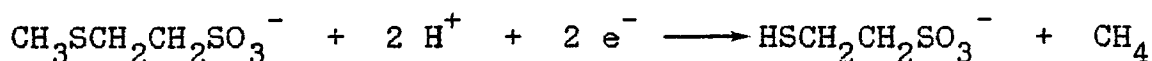
Por substituição isotópica com ^{61}Ni mostrou-se que este sinal tem origem num centro de níquel, possivelmente no estado de oxidação Ni(III). Verificou-se também que, por redução com ditionito, o sinal de Ni desaparece, o que sugere que este centro metálico está envolvido em transições redox. Por reacção com o substracto natural $-\text{CO}-$ ou com os produtos da reacção $-\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ o espectro de RPE altera-se, aparecendo um sinal complexo que pode ser decomposto em dois espectros : um, axial, com valores de g a 2,087 e 2,028 e outro, rômico, com valores de g a 2,062, 2,047 e 2,028. Por reacção da enzima com coenzima A o sinal rômico transforma-se no axial. Experiências com a enzima isolada de células crescidas em ^{61}Ni ($I=3/2$) e ^{57}Fe ($I=1/2$), utilizando CO marcado (^{13}CO) mostraram que este sinal de RPE tem origem numa espécie Ni-Fe-C, acoplada antiferromagneticamente, resultando num sistema de $S=1/2$ (12).

A enzima CO desidrogenase constitui, pois, outro exemplo de uma metalo enzima que contém Ni num estado de oxidação não usual e na qual o centro de níquel está envolvido no centro

catalítico e, eventualmente, sofre transformações redox.

II.1.3-Cofactor F₄₃₀ (13-19)

Em todos os organismos metanogénicos tem sido detectada a presença de um cofactor de baixo peso molecular, de cor amarela e não fluorescente contendo um átomo-g de Ni por mole. Este cofactor foi designado por F₄₃₀ devido ao seu espectro de absorção no visível. Através de estudos com o isótopo radioactivo ⁶³Ni verificou-se não só que o níquel era, de facto, incorporado neste factor, mas também que este composto é o cofactor da metil reductase da coenzima M de *Mb.thermoautotrophicum* (14). Esta enzima está envolvida nos últimos passos da metanogénese, catalisando a redução de metil CoM a metano:



Tem sido sugerido que o cofactor F₄₃₀ existe, pelo menos em parte, ligado a proteínas (a metil reductase da coenzima M) em *Ms.barkeri* e *Mb.thermoautotrophicum* (13,19).

Estudos biossintéticos utilizando o ácido 4-¹⁴C amino-levulinico evidenciaram que este factor tem uma estrutura tetrapirólica do tipo uroporfirina (14-16) (Figura II.2). O anel porfirínico deste cofactor é, de entre os macrociclos naturais, o mais reduzido até agora isolado. O níquel parece existir no estado de oxidação Ni(II), silencioso em RPE e, até agora, não foram detectadas transições redox neste centro metálico.

Através de EXAFS foi estudada a coordenação do níquel neste cofactor isolado e incorporado na metilreductase de *Mb.thermoautotrophicum* (19). Verificaram-se diferenças es-

truturais entre as duas situações : no cofactor isolado os dados obtidos podem ser explicados por uma coordenação de geometria quadrangular plana aos quatro átomos de azoto do macrociclo; quando ligado à enzima dá-se uma mudança de estrutura por coordenação axial de um ou dois átomos de N ou O. Estes dados são compatíveis com os obtidos por Keltjens et al (17) que, por espectroscopia de RMN, mostraram a existência de um ligando axial (figura II.2), a base 6,7 dimetil-8-ribitol-5,6,7,8 tetrahidrolumazina ou um seu derivado, possivelmente ligado ao anel.

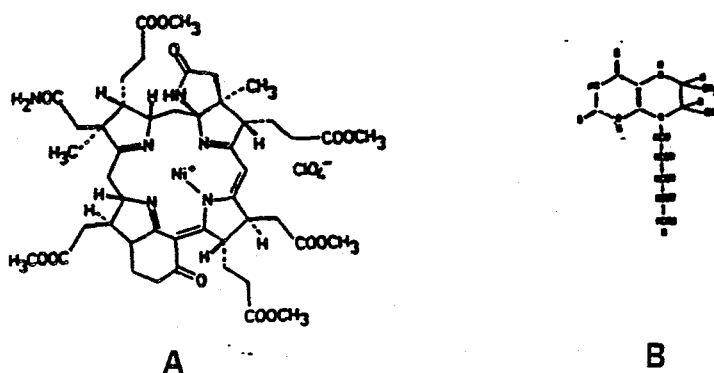


Figura II.2: A)- Estrutura do cofactor F_{430} , após metanólise (16)
B)- Ligando axial (17)

II.2-Propriedades do níquel no contexto da sua actividade biológica

No estudo de metaloproteínas é extremamente útil o conhecimento das propriedades químicas e físicas de compostos dos metais constituintes dos seus centros activos, não só para a obtenção de possíveis compostos modelo destes centros mas também para uma melhor compreensão das suas características estruturais e funcionais. Em particular, nos estudos da enzima hidrogenase, as propriedades de complexos de níquel têm sido determinantes

para a sua caracterização e para o estabelecimento de possíveis mecanismos reaccionais. Assim, descrever-se-ão algumas das características mais relevantes de compostos deste metal.

II.2.1-Propriedades Atômicas do níquel (21-24)

O níquel é um metal da primeira série de transição, de número atômico 28 e massa atômica média 58,71 e estrutura electrónica $[Ar]3d^8 4s^2$. São conhecidos vários isótopos de níquel (^{56}Ni - ^{67}Ni), dos quais o ^{58}Ni (68%) e o ^{60}Ni (26%) são os mais abundantes, tendo spin nuclear $I=0$. Em estudos bioquímicos e espectroscópicos têm sido bastante utilizados os isótopos ^{61}Ni (1.19%), com spin nuclear $I=3/2$ e ^{63}Ni , um emissor β ($E=0.067$ MeV) (Tabela II.2).

TABELA II.2:

Propriedades atômicas do níquel (21)

N^o atômico	28
Massa atômica	58.71
Isótopos	^{56}Ni - ^{67}Ni
	^{58}Ni - (68%) $I=0$
	^{60}Ni - (26%) $I=0$
	^{61}Ni - (1,19%) $I=3/2$
	^{63}Ni - emissor β ($E=0,067$ MeV)

II.2.2-Estados de oxidação do níquel (21-41)

O níquel pode existir em diversos estados de oxidação (0 a +4), sendo o Ni(II) o estado mais vulgar. De acordo com a diminuição da estabilidade dos estados de oxidação elevados ao longo da primeira série de metais de transição, os estados 3+ e 4+ são pouco frequentes aparecendo geralmente em compostos com ligandos aniônicos, com átomos doadores leves (F,O), bastante electronegativos que, por isso, não são oxidados pelo ião Ni(III). Os iões Ni(III) e Ni(IV) têm características de iões da Classe a) da classificação de Ahrlund, Chatt e Davies. Pelo contrário, os estados de oxidação inferiores, que podem ser incluídos na Classe b) daquela classificação, são encontrados em compostos com ligandos de átomos doadores pesados, como o P,S e Se. Estes ligandos - fosfinas, macrociclos tetraaza (N_4) e ditiolenos- têm a capacidade de aceitar electrões por retrodoação π para orbitais antiligantes, o que permite diminuir a densidade de carga electrónica no ião central, estabilizando os estados de oxidação baixos. De entre estes estados têm sido isolados complexos de Ni(0), essencialmente com ligandos carbonilo. Os iões Ni(II) têm características intermédias entre as classes a) e b), de acordo com a enorme diversidade de compostos de níquel neste estado de oxidação que têm sido sintetizados.

Na tabela II.3 apresentam-se os átomos doadores de possível relevância biológica que mais vulgarmente estabilizam os estados de oxidação não usuais do níquel (Ni(I) e Ni(III)). Esta tabela permite verificar que estes estados de oxidação do níquel podem ser estabilizados por ligandos vulgarmente encontrados em

sistemas biológicos (macrociclos, aminoácidos, peptidos) e, como se viu anteriormente, nas enzimas que contêm níquel estes são de facto os ligandos deste metal. Por vezes, o mesmo tipo de ligando tem a possibilidade de estabilizar quer os estados de oxidação elevados (Ni(III)), quer os estados de oxidação baixos (Ni(I)).

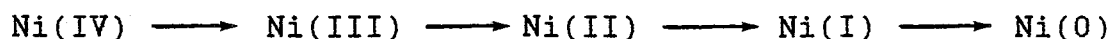
TABELA II.3 (a):

Átomos doadores que estabilizam os estados de oxidação Ni(I) e Ni(III)

Átomo doador	Ligando	Estado de oxidação
H	Hidreto	+ 1
N	Aminoácidos	+ 1, + 3
	Peptidos	+ 3
	Macrociclos	+ 1, + 3
S	Peptidos	+ 3

(a) Adaptada da referência (25)

Devido à existência dos vários estados de oxidação do níquel (0 a +4), são possíveis diversas transições de oxidação-redução:



A baixa estabilidade dos estados de oxidação diferentes de +2 leva a que para a maioria dos compostos de níquel estas transições ocorram a potenciais bastante positivos, cerca de +2 V para Ni(IV)/Ni(III) e de +1 V para Ni(III)/Ni(II), ou bastante negativos, cerca de -1 V para Ni(II)/Ni(I) e perto de -2 V para Ni(I)/Ni(0). Contudo, alguns ligandos estabilizam preferencial-

mente aqueles estados de oxidação permitindo uma diminuição ou um aumento significativo dos potenciais a que ocorrem as transições, tornando estáveis os iões Ni(IV), Ni(III) e Ni(I) em solução aquosa.

Os estados de oxidação Ni(I) e Ni(III) são os únicos que apresentam sempre um spin electrónico semi-inteiro (Ni(I) - $S=1/2$ e Ni(III) - $S=1/2$ ou $3/2$), pelo que são activos em RPE. Os iões Ni(II), com $S=1$ em algumas geometrias, podem também dar origem a sinais de RPE, embora geralmente de muito fraca intensidade, correspondendo a transições "proibidas" com $\Delta m_s=2$ e aparecendo a valores de g superiores a 2. Assim, os sinais de RPE detectados para as hidrogenases, característicos de sistemas com $S=1/2$, terão de resultar do ião níquel num dos estados de oxidação Ni(III) ou Ni(I). Por isso, serão discutidas algumas das características electroquímicas e de espectroscopia de RPE de compostos de níquel nestes estados de oxidação. Seleccionaram-se compostos que envolvem ligandos com átomos doadores vulgarmente encontrados em sistemas biológicos (O,N,S,P), embora a maioria dos ligandos, com a excepção dos macrociclos e peptidos, não tenha carácter biológico. Serão apresentados valores de potenciais para as transições redox Ni(III)/Ni(II) e Ni(II)/Ni(I) apenas de compostos para os quais se identificou por espectroscopia de RPE o estado de oxidação do produto final. De facto, devido à instabilidade destes estados de oxidação, é frequente a formação de complexos com ligandos radicalares após as reacções de redução ou oxidação, o que indica que a transição redox envolve o ligando e não o ião central Ni(II), que mantém essencialmente o seu estado de oxidação. Medidas de susceptibilidade magnética, que têm sido realiza-

das por vezes para determinar estes estados de oxidação, podem levar a conclusões erradas, pois os electrões desemparelhados que contribuem para os momentos magnéticos dos compostos estudados podem estar localizados em parte ou totalmente nos ligandos, como se verá mais adiante. Em particular, a espectroscopia de RPE pode, pelo menos, distinguir entre os estados Ni(0), com S=0 e Ni(II), com S=1 ou S=0, frequentemente silenciosos em RPE e Ni(I) (S=1/2) e Ni(III) (S=1/2 ou S=3/2), activos em RPE.

II.2.2.1-Estado de oxidação Niquel (I)

Este ião tem um sistema electrónico $3d^9$. Os seus compostos são habitualmente muito reactivos, conduzindo à redução de substractos orgânicos. São também susceptíveis de dissociação e a reacções de desproporcionação ($2 \text{ Ni(I)} \rightarrow \text{Ni(0)} + \text{Ni(II)}$).

Os compostos de Ni(I) são geralmente gerados em solução, por métodos químicos ou electroquímicos, através da redução de compostos de Ni(II). Podem também ser obtidos por oxidação de compostos de Ni(0). Apenas em alguns casos foram isolados no estado sólido.

Na tabela II.4 são apresentados valores de potenciais de redução de compostos de Ni(II), retirados de trabalhos em que simultaneamente se realizaram estudos de RPE com vista à determinação do estado de oxidação final do níquel.

-Ligandos Macrocíclicos-

Ligandos macrocíclicos tetraaza estabilizam o estado de oxidação Ni(I) (27,34,38,44). A redução dos compostos de Ni(II) pode dar origem a dois tipos de produtos:

-redução do ião central, formando compostos de Ni(I);

Tabela II.4: Potenciais de redução de compostos de Ni(II) e sinais de RPE dos produtos de redução

Composto (Referência)	Atomo doador	E (V vs ENH)	EPR valores de g			Estado de Oxidação
Macrociclos	N					
Tetraaza (27, 34, 38, 44)			$g_{ }$	g_{\perp}		
Neutros (a)		-1,1/-0,7	2,195 a	2,053 a		Ni(I)
			2,266	2,066		
		-0,93/-0,16		2,00		Ni(II)-L'
Monoaniônicos		-1,7/-1,74	---			?
Dianiônicos		+0,85/+0,86	---			?
<hr/>						
Saturado		-0,98/-0,38	2,27	2,137	2,086	Ni(I)
			2,33	2,069	2,069	Ni(I)
<hr/>						
Ditioleños (32, 35, 36, 45)						
Ni(MNT) ₂ ²⁻ (b)	S	-1,44	2,21	2,081	2,062	Ni(I)
Ni(L _P)(L _S)(c)	P,S	-1,0/-0,05	g_m : 2,141/2,062 (d)			
			g_{max} : 2,25/2,16			Ni(I)
			g_{min} : 2,067/2,038			

(a) Redução irreversível; (b) MNT- maleonitriloditiolato;

(c) L_P, L_S- ligandos mistos (fosfinas e ditiolatos);

(d) $g_m = (g_x + g_y + g_z)/3$

-redução do ligando, formando compostos de Ni(II) com ligandos radicalares (27).

No primeiro caso, os potenciais de redução são bastante negativos (variam entre -0,7 e -1,1 V) e a redução é, em geral, irreversível. Os sinais de RPE são axiais, com $g_{||} > g_{\perp}$ ($g_{||}$ na região de 2,2 e g_{\perp} perto de 2,05). Exceptua-se o caso do composto com o ligando 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano, que apresenta sinais com maior axialidade ($g_{||}=2,333$ e $g_{\perp}=2,069$) ou mesmo rômnicos (2,27, 2,137 e 2,086), conforme os substituintes do ligando cíclico (44). Estes sinais são característicos de sistemas d^9 com $S=1/2$, de simetria axial, ou quase, em que o electrão desemparelhado se encontra numa orbital $d_{x^2-y^2}$, de acordo com a análise apresentada em Apêndice.

Verifica-se também que os potenciais se tornam mais negativos quando se aumenta a insaturação do anel. Existe uma correlação entre os potenciais de redução Ni(III)/Ni(II) e Ni(II)/Ni(I): quanto menos positivos os primeiros, mais negativos os segundos. Esta correlação resulta possivelmente do que se designa por "Hole Size Effect": o aumento do tamanho da cavidade de coordenação do anel favorece a redução $Ni(II) \rightarrow Ni(I)$ e desfavorece a oxidação $Ni(II) \rightarrow Ni(III)$. Os ligandos monoaniônicos conduzem a potenciais de redução mais negativos.

No segundo caso, obtêm-se sinais de RPE a $g \approx 2$, característicos de sistemas radicalares, indicando que o produto de redução é, de facto, um composto de Ni(II) com um ligando radical.

-Ligandos Ditiolenos- (32, 35,36,45)

Os compostos de níquel com ligandos ditioleno são, even-

tualmente , de maior interesse visto que o níquel , pelo menos nas hidrogenases de *D.gigas* (66) e *Mb.thermoautotrophicum* (67), se encontra coordenado a átomos de enxofre.

Os espectros de RPE obtidos para estes compostos são também axiais, com g_{\max} entre 2,25 e 2,16 e g_{\min} ($\sim g_{\text{med}}$) a 2,067-2,038. Os potenciais de redução são negativos, embora menos que no caso anterior (-1,44/-0,05 V). O composto que apresenta um potencial menos negativo (ligandos: duas trifenilfosfinas e $\text{BzI} \text{NCS}_2^-$ - benzil ditiocarbamato) tem um sinal de RPE com valores de g a 2,258 , 2,064 e 2,064. Nestes sistemas tem-se $g_{||} > g_{\perp}$, o que indica uma estrutura electrónica diferente (alguns autores propuseram que o electrão se encontra numa orbital d_{xy}). A axialidade destes sinais de RPE tem sido atribuída a uma elevada deslocalização do electrão desemparelhado entre o ião central e os ligandos de enxofre. Aliás, a constante de acoplamento orbita-spin para o enxofre é muito elevada, o que se traduz num desvio do valor de g para valores superiores a 2,00 em radicais de enxofre. Assim, embora alguns autores tenham atribuído aqueles sinais de RPE a um composto com o níquel no estado de oxidação Ni(I), torna-se impossível determinar com rigor um estado de oxidação formal para o ião níquel naqueles compostos, sendo mais correcto falar de sistemas deslocalizados.

-Outros Ligandos-

Outros compostos de níquel (I) têm sido estudados por espectroscopia de RPE, dos quais salientamos os seguintes (25): - cianocomplexos, com valores de g a 2,13-2,14 ($g_{||}$) e a 2,03-2,04 (g_{\perp}); complexos com ligandos nitrogenados, em que os compostos de

Ni(I) foram obtidos por irradiação com raios em matrizes geladas de complexos de Ni(II). Os valores de g dos sinais de RPE obtidos para estes compostos encontram-se na tabela II.5.

Tabela II.5: Valores de g de compostos de Ni(I) com ligandos nitrogenados (25)

Composto	Valor de g	
	$g_{ }$	g_{\perp}
$\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^+$	2,466	2,076
$\text{Ni}(\text{py})_4(\text{H}_2\text{O})_2^+$	2,282	2,068
$\text{Ni}(\text{en})_2(\text{H}_2\text{O})_2^+$	2,282	2,065
$\text{Ni}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2^+$	2,259	2,074

II.2.2.2-Estado de oxidação Niquel(III)

Os compostos de níquel(III) são também pouco estáveis: por oxidação de compostos de Ni(II) formam-se frequentemente produtos em que ocorreu oxidação do ligando. O aquocomplexo de Ni(III) é instável em solução aquosa pelo que não é possível determinar experimentalmente o valor do potencial redox para a transição Ni(III)/Ni(II) nesta solução. O valor deste potencial foi estimado por diversos autores (42), obtendo-se um valor bastante elevado, cerca de +3,7 V. Como se verá adiante, os potenciais redox para esta transição em diversos complexos de níquel são muito inferiores, situando-se geralmente perto +1 V. Esta diminuição traduz uma enorme diferença nas constantes de estabilidade para os dois estados de oxidação: os complexos de Ni(III) terão de ser 10^{30} a 10^{55} vezes mais estáveis que os correspondentes complexos de Ni(II) para explicar este facto. Embora esta diferença

nas constantes de estabilidade seja muito elevada, têm sido encontrados valores semelhantes para outros sistemas redox de que se dispõe de valores experimentais. Outra possível explicação para este decréscimo do potencial seria a ocorrência de um aumento do número de coordenação do níquel concomitante com a oxidação a Ni(III) como, aliás, se verifica para os complexos de Ni(II) com ligandos peptídicos (passagem do número de coordenação 4 no composto de Ni(II) para números de coordenação 5 ou 6 nos produtos de oxidação contendo o ião Ni(III)). Serão discutidos dois tipos de complexos que parecem de maior interesse para o estudo das hidrogenases: complexos com ligandos peptídicos e complexos com ligandos macrocíclicos tetraaza (N_4).

-Ligandos peptídicos- (30,33,40,41)

Os complexos de Ni(II) com ligandos peptídicos são geralmente de geometria quadrangular plana. Em solução ocorre por vezes a coordenação, nas posições axiais, de moléculas do solvente, com formação de espécies penta ou hexacoordenadas. Por oxidação química ou electroquímica têm sido obtidos complexos de Ni(III), estáveis em solução. Esta estabilização pelos peptídeos tem sido atribuída à ligação do grupo $-(C=O)N$, presente nas formas desprotonadas destes ligandos. Os valores de potencial redox e do factor g de sinais de RPE para uma série de compostos deste tipo encontram-se na tabela II.6. Os valores de E'_0 são elevados (cerca de + 0,9 V) e pouco sensíveis à força do ligando, apresentando apenas uma ligeira diminuição com o valor do campo de ligandos. A ligação axial por átomos de azoto favorece a oxidação a Ni(III), embora os peptídeos contendo grupos histidina

TABELA II.6 :Potenciais de Oxidação de peptido complexos de Ni(II) e valores de g dos sinais de RPE dos produtos de Ni(III)

Ligando (átomo doador)	E'_O (V vs ENH)	Valor de g			
		g_m	g_x	g_y	g_z
Peptidos (Glu)_n(X)_m (N,O)					
G ₃	0,85	2,184	2,242	2,295	2,015
G ₄	0,79	2,195	2,297	2,278	2,010
G ₅	0,83	2,210	2,340	2,278	2,011
G ₃ a	0,83	2,199	2,31	2,281	2,006
GGA	0,85	2,17	2,23	2,29	2,01
GAG	0,85	2,17	2,23	2,28	2,01
AGG	0,85	2,18	2,24	2,30	2,01
GGV	0,89	2,18	2,25	2,27	2,01
β-AGG	1,04	2,17	2,28	2,22	2,02
GG-β-A	0,84	2,16	2,24	2,24	2,01
Peptidos (his) (N,O)					
G ₂ H	0,96	2,183	2,256	2,278	2,015
GGH, (NH ₃) ₂	--	2,116	2,162	2,162	2,024
GHH	--	2,174	2,252	2,252	2,018
GGHG	0,95	--	--	--	--
ApAHL	0,94	--	--	--	--
Peptidos (S) (N,O,S)					
M-GGH	--	2,166	2,274	2,206	2,017
M-GGG	--	2,169	2,270	2,223	2,014
M-HH	--	2,160	2,264	2,196	2,021
M ₂ PG	--	2,114	2,163	2,163	2,015
M-GH	--	2,166	2,274	2,206	2,017

G-glicina (Gli); H-histidina (his); A-alanina ; V-valina ;
a-amida ; M- N-mercaptoacetil ; L-lisina ; Ap - ácido aspártico
M₂PG- 2,3 dimercaptopropionilglicina. Adaptado Ref. (30, 33, 40, 41)

tenham valores de potencial um pouco maiores, o que é atribuído a uma combinação de efeitos estereoquímicos e de retrodoação nestes complexos. Do mesmo modo, ligandos volumosos estabilizam preferencialmente o estado Ni(II).

Observa-se também a influência do anel de quelação: o ião Ni(III) é estabilizado pelos anéis mais pequenos. Sugiura et al (40) não publicaram valores para o potencial de oxidação de complexos envolvendo ligandos coordenados por átomos de enxofre, que permitiriam uma comparação com os valores das hidrogenases; no entanto, as oxidações destes compostos foram efectuadas com um oxidante muito forte -hexacloroiridato(IV)-, o que sugere potenciais de oxidação elevados.

Os sinais de RPE dos produtos de oxidação são rômnicos e apresentam valores de g_m superiores a 2 (2,1 a 2,2), o que indica que o electrão desemparelhado tem carácter essencialmente metálico, isto é, o ião níquel (II) foi de facto oxidado a Ni(III). Em todos os casos verifica-se que $g_x, g_y > g_z$, o que sugere uma geometria octaédrica com distorção tetragonal para estes produtos, encontrando-se o electrão desemparelhado na orbital d_{z^2} , numa situação de spin baixo ($S=1/2$), de acordo com as equações apresentadas em Apêndice para os valores de g de compostos de iões d^7 nesta geometria:

$$g_x = 2 - 6 \lambda / \Delta E(d_{yz} - d_{z^2})$$

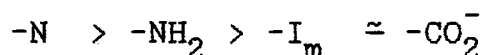
$$g_y = 2 - 6 \lambda / \Delta E(d_{xz} - d_{z^2})$$

$$g_z = 2$$

Os valores de g são superiores a 2, visto que a constante de acoplamento órbita-spin (λ) é inferior a zero (igual a -750 cm^{-1}

para o ião livre, (41)). Uma previsão correcta dos valores de g só é possível conhecendo os valores para as diferenças de energia entre as orbitais d_{xz} (d_{yz}) e d_{z^2} .

O ligando peptido coordena-se nas posições equatoriais enquanto as posições axiais são ocupadas por moléculas de solvente. Esta coordenação foi evidenciada pelo aparecimento de linhas de desdobramento superhiperfino na linha a g_z em soluções amoniais. Lappin et al (41) verificaram que os valores de g_x são directamente proporcionais à força dos ligandos equatoriais:



O mesmo efeito observa-se em g_z em relação aos ligandos axiais, embora com menos intensidade, o que está também de acordo com a geometria tetragonal proposta para estes complexos. A análise dos espectros de RPE de compostos com peptidos sulfurados é particularmente interessante, atendendo à coordenação do níquel nas hidrogenases. Os sinais têm em geral maior rombicidade e maior valor de g_x que no caso de coordenação por azoto, sugerindo uma ordem $S^- > NH_2$ na força dos ligandos equatoriais. O complexo com o ligando disulfidril (M_2PG), que corresponde a um maior número de átomos de enxofre coordenados é uma excepção, pois o espectro é mais axial. Assim, Sugiura et al (40) propuseram a coordenação de Ni(III) a S-cis nas hidrogenases, mas em que o número de átomos de enxofre coordenados seria inferior a quatro. Esta hipótese está em contradição com os resultados de EXAFS para as hidrogenases de *D.gigas* e *Mb.thermoautotrophicum*, que sugerem a presença de quatro a seis átomos de enxofre na primeira esfera de coordenação do níquel (66,67). De facto, se atendermos aos valores de g apresentados na Tabela II.6 verifica-se que a

partir destes valores não é possível atribuir um dado conjunto de ligandos a iões Ni(III); por exemplo, o complexo com o peptido GGG apresenta um sinal bastante rômico e com valores de g próximos dos obtidos para várias hidrogenases, embora os átomos doadores sejam diferentes. Assim, a principal conclusão que se pode obter pela espectroscopia de RPE é a determinação do estado de oxidação do produto de oxidação dos complexos de Ni(II).

Bossu *et al* (43) apresentaram ainda outro resultado relevante: complexos de Ni(II) com certos ligandos peptídicos são oxidáveis em solução aquosa por oxigénio, em reacções autocatalisadas por um intermediário contendo o ião Ni(III); esta observação pode ser pertinente para explicar a inactivação de hidrogenases contendo níquel, na presença de oxigénio.

-Ligandos macrocíclicos- (27,29,39)

Ligandos macrocíclicos tetraaza semelhantes aos apresentados para o ião Ni(I) estabilizam também o estado de oxidação Ni(III). Os potenciais redox para a transição Ni(III)/Ni(II), determinados electroquimicamente por oxidação dos compostos de Ni(II), variam entre 0,1 e 1,9 V. Esta larga gama de potenciais obtém-se por variação da estrutura e substituintes do anel macrocíclico. O potencial redox para aquela transição é tanto mais baixo quanto mais forte é a interacção do ião Ni(III) com os átomos de azoto coordenantes. Fabbrizzi (29) mostrou que esta estabilização do ião Ni(III) pode também ser conseguida por ligandos do mesmo tipo mas não cíclicos ($E=+1,39$ V). Zeigerson *et al* (39) mostraram ainda que por coordenação axial se pode diminuir o valor do potencial redox, estabilizando-se o estado de

oxidação elevado, tanto mais quanto mais forte for aquele ligando axial.

Os espectros de RPE dos produtos de oxidação são axiais, com valores de g superiores a 2, indicando a existência de níquel no estado Ni(III) de baixo spin ($S=1/2$). Para os complexos octaédricos verifica-se que g_{\perp} (cerca de 2,15 a 2,21) é superior a g_{\parallel} (perto de 2,02), indicando que o electrão desemparelhado se encontra numa orbital d_{z^2} ; para os complexos quadrangulares planos, verifica-se a situação inversa, traduzindo que o electrão desemparelhado ocupa uma orbital $d_{x^2-y^2}$.

-Outros Ligandos-

Outros complexos de níquel(III) estudados por espectroscopia de RPE, que têm sido referidos na literatura, serão mencionados brevemente:

- Por irradiação de Ni(EDTA)^{2-} em solução aquosa obtém-se um composto de Ni(III), que apresenta um espectro de RPE axial, com $g_{\parallel}=2,336$ e $g_{\perp}=2,139$. Estes valores de g foram explicados atribuindo a este complexo uma geometria octaédrica com distorção tetragonal, em que o ligando no plano equatorial se liga em posição cis, estando o electrão desemparelhado numa orbital $d_{x^2-y^2}$ (47).

- O complexo $\text{Ni}[\text{C}_6\text{H}_3-(\text{CH}_2\text{NMe}_2)_2\text{-o,o'}]\text{I}_2$, em que o ião Ni(III) se encontra numa geometria quadrangular plana coordenado a dois iões halogeneto, a dois átomos de azoto e a um átomo de carbono (ligação directa Ni-C), apresenta um sinal de RPE rômboico com valores de g a 2,366, 2,190 e 2,02, compatível com uma configuração electrónica de baixo spin, com o electrão desemparelhado

numa orbital d_{z^2} . O potencial para a transição Ni(II)/Ni(III) foi determinado por voltametria cíclica: a transição é irreversível e ocorre a 0,38 V (48). Este composto é um dos raros exemplos de complexos de Ni(III) isolados no estado sólido e estáveis na presença de oxigênio.

- Complexos de Ni(II) com etilenodiamina ou aminas análogas e iões cloreto convertem-se em compostos sólidos de Ni(III) por reacção com cloro gasoso. Os sinais de RPE destes sólidos são axiais, com $g_{||}$ entre 2,03 e 2,04 e g_{\perp} entre 2,174 e 2,185, novamente de acordo com uma estrutura electrónica de baixo spin (25).

- Têm sido gerados em solução, por métodos químicos ou electroquímicos, produtos de oxidação de ditiolenos de Ni(II) (45,46,49,51). Estas oxidações são quase sempre irreversíveis e envolvem os ligandos. Os sinais de RPE destes produtos são geralmente quase axiais com g_{max} a cerca de 2,15 e $g_{med} \sim g_{min} \sim 2,0$. Embora alguns autores tenham atribuído estes sinais a complexos de Ni(III), uma análise teórica, pela teoria de orbitais moleculares, tem evidenciado que a maioria destes compostos são de facto complexos de Ni(II) com ligandos radicalares, isto é, o electrão desemparelhado encontra-se fundamentalmente em orbitais moleculares com forte contribuição do ligando. Como já foi referido, o enxofre tem uma constante de acoplamento orbita-spin bastante elevada, o que explica o desvio do valor de g de radicais de compostos de enxofre para valores superiores a 2.

II.2.2.3- Determinação do estado de oxidação de iões Níquel

Os compostos de Ni(I) apresentam em geral espectros de RPE

axiais, enquanto os de Ni(III) têm maior rombicidade. Contudo, o número de sistemas estudados é ainda relativamente pequeno e para o ião Ni(I) envolve ligandos que, pelas suas características electrónicas, podem perturbar significativamente os sinais de RPE, contribuindo para uma maior deslocalização da carga no ião central e, assim, diminuir os valores de g . Neste aspecto, é curioso verificar que o composto de Ni(I) que apresenta maior rombicidade no sinal de RPE envolve um ligando macrocíclico saturado, não se fazendo sentir aquele efeito. Comparando os valores de g de compostos de Ni(I) e Ni(III) conclui-se também que a técnica de RPE não permite, *a priori*, distinguir entre estes dois estados de oxidação. Verifica-se ainda a partir dos dados apresentados que apenas com base na espectroscopia de RPE não é possível determinar uma dada coordenação, pois obtêm-se sinais com valores de g muito semelhantes para ligandos com diferentes átomos doadores.

Os valores de potencial para a redução Ni(II)/Ni(I) são em geral bastante negativos (perto de -1 V). Contudo, tal como para a espectroscopia de RPE, dispõe-se ainda de um número reduzido de valores, o que não permite efectuar comparações com os valores obtidos para a enzima hidrogenase. Além disso, os estudos electroquímicos realizados envolvem também ligandos susceptíveis de participar na transição redox, não permitindo atribuir os valores de potencial a uma mudança efectiva do estado de oxidação do ião níquel.

As transições Ni(III)/Ni(II) ocorrem a potenciais bastante elevados (cerca de +1 V); uma diminuição significativa deste valor pressupõe uma estabilização extremamente forte do estado

Ni(III), ou seja, uma coordenação muito peculiar do ião níquel (III). Assim, para uma dada coordenação, não é muito provável que as transições Ni(III)/Ni(II) e Ni(II)/Ni(I) possam ocorrer a valores de potencial relativamente próximos. Aliás, para o caso dos ligandos macrocíclicos verifica-se que a diferença entre os valores de potencial redox para ambas as transições é aproximadamente constante, ou seja, uma estabilização de Ni(III) leva a uma desestabilização de Ni(I).

II.2.4-Coordenação de complexos de níquel (21,23-26,29)

A química do níquel é extremamente diversificada em termos de números e geometrias de coordenação (Tabela II.7).

TABELA II.7:
Geometrias e números de coordenação mais frequentes
em complexos de níquel (21,23,24)

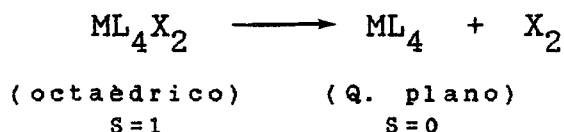
Estado de oxidação	Configuração 3d	Número de Coordenação	Geometria
Ni(0)	d ¹⁰	4	Tetraédrica
Ni(I)	d ⁹	4	Tetraédrica Q.Plana
		5	P.Quadrangular
Ni(II)	d ⁸	4	Tetraédrica Q.Plana
		5	P.Quadrangular
		6	B.Trigonal Octaédrica
Ni(III)	d ⁷	5	B.Trigonal
		6	Octaédrica
Ni(IV)	d ⁶	6	Octaédrica

-Níquel(0). Níquel(I)-

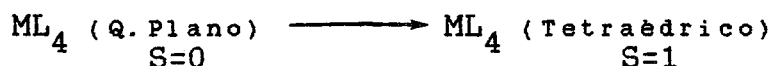
O número de coordenação 4 é o mais vulgar, com geometria tetraédrica ou, por vezes, quadrangular plana. São frequentes as espécies diméricas de compostos de Ni(I), diamagnéticas.

-Níquel(II)-

Os números e geometrias de coordenação são extremamente diversos para este estado de oxidação, embora os complexos hexacoordenados octaédricos sejam os mais comuns ($S=1$, silenciosos em RPE). Nestes últimos complexos são frequentes distorções tetragonais resultando numa geometria intermédia entre a octaédrica e a quadrangular plana, o que provavelmente traduz uma energia de estabilização de campo de ligandos (EECL) maior em complexos quadrangulares planos do que em octaédricos para sistemas d^8 . São também vulgares equilíbrios conformacionais em complexos octaédricos de níquel, dependentes da temperatura e da concentração, que resultam numa alteração das propriedades magnéticas dos complexos:



Estes equilíbrios envolvem frequentemente moléculas de solvente como ligandos axiais. Os complexos tetracoordenados têm geralmente geometria quadrangular plana (EECL mais elevada) e são diamagnéticos. São também vulgares equilíbrios conformacionais do tipo



-Niquel(III). Niquel(IV)-

Os complexos de níquel nestes estados de oxidação têm em geral número de coordenação 6 e geometria octaédrica, de acordo com as previsões da teoria do campo cristalino para sistemas d^7 e d^6 . São também conhecidos complexos de Ni(III) penta-coordenados de geometria pirâmide quadrangular.

Observa-se uma tendência para o aumento do número de coordenação dos complexos de níquel, paralelamente ao aumento do estado de oxidação.

II.3-Sistemas Modelo da enzima Hidrogenase

Podem considerar-se essencialmente dois tipos de sistemas modelo de metalo-enzimas:

- i) Compostos com estrutura e composição semelhante à dos centros activos da enzima, com propriedades físico-químicas e actividade catalítica idênticas ; este tipo de composto constituiria o que se poderia designar por um modelo ideal, permitindo analisar especificamente as propriedades dos centros catalíticos sem a interferência da cadeia polipeptídica. Deste modo é, também, possível determinar a influência daquela cadeia na reactividade e nas propriedades dos centros metálicos e verificar de que modo essas características são moduladas pela cadeia polipeptídica.
- ii) Compostos que, embora com composição e estrutura diferentes, possuem actividade catalítica semelhante. Estes sistemas permitem principalmente analisar os mecanismos reaccionais das enzimas.

Para além dos complexos sintetizados por Sugiura et al (40), já referidos, e que apenas possuem uma coordenação próxima

da do níquel nas hidrogenases contendo este metal e apresentam um sinal de RPE com valores de g semelhantes, até ao momento não tem sido referida na literatura a síntese de compostos modelo do tipo i). No entanto, diversos compostos têm sido apontados como modelos do tipo ii), que se podem designar por "modelos funcionais" pois apenas pretendem reproduzir a actividade catalítica da enzima. Vários sistemas deste tipo serão descritos brevemente.

II.3.1-Bisditíolenos de níquel

Complexos com ligandos ditíoleno do tipo representado na figura II.3 (52) são bastante reactivos em reacções de transferência electrónica, podendo actuar como fonte ou "poços" de electrões.

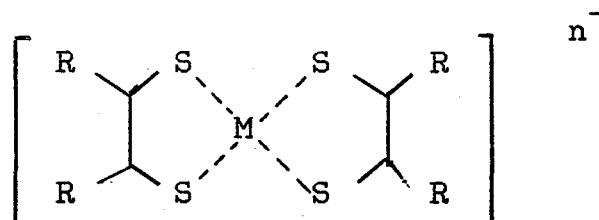


Figura II.3: Bisditíolenos de metais de transição

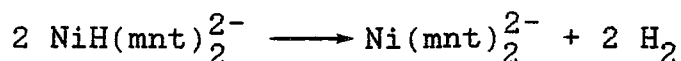
Ditíolenos de níquel, cobalto e ródio têm sido usados como geradores de hidrogénio:

$[\text{Ni}(\text{Ph}_2\text{C}_2\text{S}_2)_2]^{2-}$, envolvido na produção fotoquímica de hidrogénio, a partir de água (52);

$[\text{Co}(\text{mnt})_2]^{2-}$ ou $[\text{Rh}(\text{mnt})_2]^{2-}$, envolvidos na produção de hidrogénio por redução electroquímica na presença de ácidos orgânicos fracos (53). O complexo análogo de níquel, $[\text{Ni}(\text{mnt})_2]^{2-}$,

reage muito rapidamente após redução na presença daqueles ácidos. Assim, não é possível saber se ocorre apenas uma oxidação directa

ou se esta oxidação se dá através de um intermediário hidreto, com formação de hidrogénio:



S.Alvarez e R.Hoffmann (52) realizaram cálculos teóricos de orbitais moleculares pelo método de Hückel para este tipo de compostos de níquel e ródio. Como já referido anteriormente, é difícil determinar com rigor o estado de oxidação formal do ião metálico nestes complexos, ou seja, determinar se estes ligandos se comportam como neutros ou dianiónicos. Estes autores sugerem que os ligandos podem ser considerados dianiónicos, embora o seu comportamento possa variar com o metal e com a carga total do complexo.

O diagrama de orbitais moleculares destes complexos é compatível com o diamagnetismo de complexos com iões d^8 e com o paramagnetismo dos complexos de iões d^7 , nos quais o electrão desemparelhado se encontra numa orbital molecular com contribuição do metal (através da orbital d_{xz}) e do ligando. Baseados neste facto, propuseram um ciclo catalítico para a evolução de hidrogénio a partir de ditiolenos de níquel(III) ou ródio(II) (figura II.4), que envolve duas reduções monoelectrónicas do metal. Após a primeira redução, o protão pode ligar-se ao ião metálico, que lhe doa dois electrões e, assim, torna-se formalmente num ligando hidreto oxidando o ião níquel(II) a níquel(IV). A adição de outro electrão reduz o ião Ni(IV) a Ni(III) e, por novo ataque electrofílico de outro protão, pode formar-se uma molécula de hidrogénio ligada de modo apical. O ataque do segundo protão nesta posição é favorável, devido à elevada densidade electrónica em torno do ião hidreto coordenado ao metal.

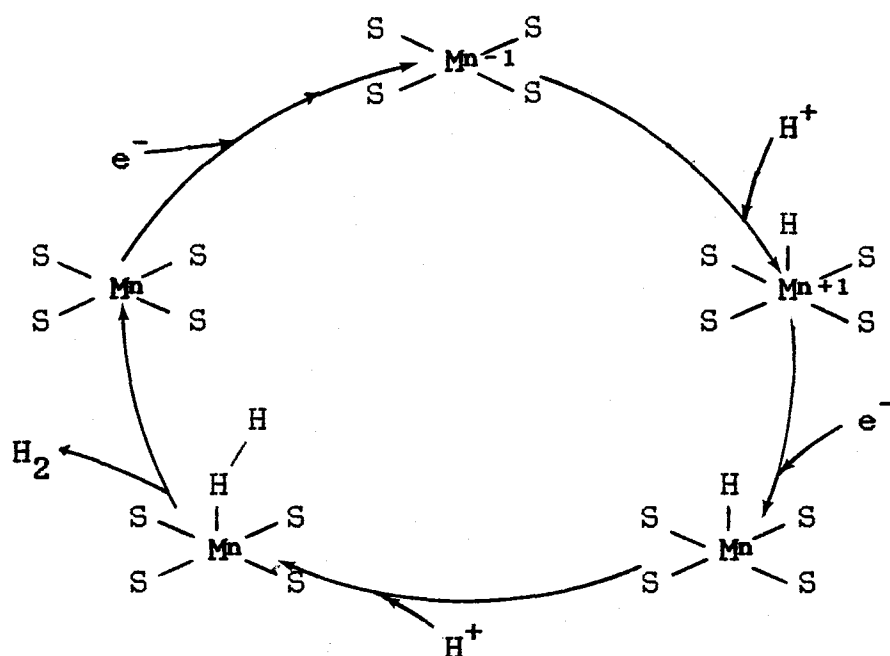


Figura II.4: Ciclo catalítico para a produção de hidrogênio a partir de ditiolenos de níquel (52)

A ligação $M-H_2$ enfraquece e a molécula de H_2 pode facilmente libertar-se. A adição do protão e a eliminação da molécula de hidrogênio podem ocorrer de modo concertado. Um processo alternativo, envolvendo a ligação do segundo protão a um átomo de enxofre do ligando, não enfraqueceria a ligação $M-H$, pois os átomos de hidrogênio estariam a interactuar com orbitais moleculares diferentes, sendo então necessária uma activação substancial para levar à formação de hidrogênio.

Outro esquema analisado pelos autores envolveria um ataque dos protões aos átomos de enxofre, seguido da formação da ligação $H-H$, com quebra concertada das ligações $S-H$. No entanto, o processo é proibido por simetria em reacções térmicas, sendo possível apenas a partir de estados excitados.



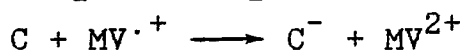
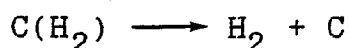
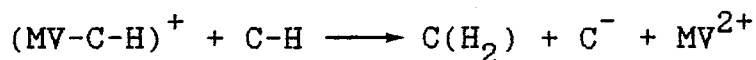
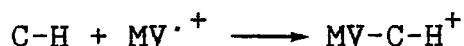
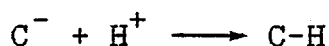
O esquema apresentado na figura II.4 , embora envolva um estado de oxidação do níquel que não tem sido considerado para a hidrogenase, tem diversos aspectos relevantes para a construção de um mecanismo reaccional para a activação de hidrogénio pelas hidrogenases (Capítulos V e X):

- a possibilidade teórica de os estados de oxidação elevados do níquel , em particular o níquel(III), estarem envolvidos na formação de hidretos;
- a ligação da molécula de hidrogénio de modo apical, sugerindo assim um mecanismo para a eliminação final desta molécula;
- a existência de dois passos de transferência electrónica, que ocorrerão possivelmente a diferentes valores de potencial;
- a estabilização destes estados de oxidação elevados por ligandos cujo átomo doador é o encontrado nas hidrogenases (enxofre);
- a necessidade de ocorrer uma transferência bielectrónica do ião central para o protão (no caso da evolução de hidrogénio) ou no sentido inverso (caso do consumo de hidrogénio). Esta transferência pode envolver uma participação dos ligandos, não sendo necessário postular um estado de oxidação formal Ni(IV) para o ião níquel.

Contudo, este esquema é apenas teórico e, até ao momento, não têm sido apresentadas evidências experimentais que permitam identificar os vários intermediários envolvidos.

E. Hontzopoulos e colaboradores (54) mostraram recentemen-

te que o complexo monoanião bis(2-cloroditiobenzil)níquelato(II) (C^-), de natureza radicalar, catalisa a produção ou o consumo de hidrogénio na presença de metil viologénio (MV) reduzido. O mecanismo proposto para a produção de hidrogénio é o seguinte

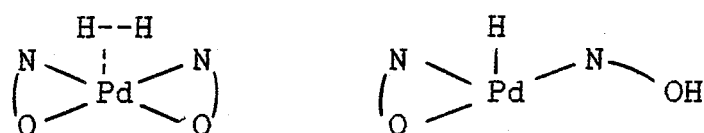


Novamente, não são apresentadas evidências experimentais que identifiquem inequivocamente os intermediários propostos. Assim, o principal interesse deste exemplo reside no facto de mostrar que ditiolenos de níquel têm a capacidade de catalisar a oxidação de hidrogénio ou a redução de protões com a formação de H_2 , na presença de transportadores de electrões com potencial redox apropriado.

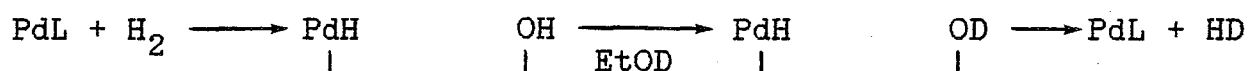
II.3.2-Complexo Pd-Salen

Compostos de Níquel, Paládio e Platina, com ligandos cíclicos azotados foram propostos por Olivé e Olivé (55) como modelos para a enzima hidrogenase, antes de ser conhecida a presença de níquel nesta enzima. Foram usados como ligandos o SALEN - N,N'- etilenobis(salicilenoiminato), o ACACEN - N,N'- etileno(acetilacetoinimina), a dimetilglioxima e o ácido picolinico. O complexo Pd(salen) revelou-se o mais efectivo na produção de hidrogénio, embora os autores refiram que os outros complexos têm um comportamento semelhante. Estudaram-se as reacções de

hidrogenação do hexeno-1 e a reacção de permuta H/D. A cinética de ambas as reacções (variação da velocidade da reacção em função das concentrações de substratos e catalisador) é semelhante à da hidrogenase o que levou aqueles autores a proporem estes complexos como modelos. Verificou-se também que o máximo de actividade catalítica era obtido em soluções ligeiramente básicas, tal como acontece com algumas hidrogenases. Foi proposto o seguinte mecanismo reaccional:



O protão libertado é estabilizado por um oxigénio fenólico do ligando salen, que se dissocia em simultâneo com a cisão da molécula de H_2 . Um mecanismo semelhante, envolvendo a quebra de uma ligação Ni-S, foi proposto para a catálise de reacções de isomerização de olefinas pelo hidreto derivado do composto $\text{Ni}(\text{L})_2$ (L= 1,tioetil-2,difenilfosfinaetano) (63). A reacção de permuta, usando etanol deuterado como solvente, pode ser explicada pela seguinte sequência de reacções:



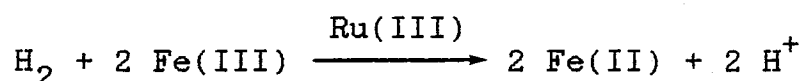
A formação de D_2 necessitaria de passos suplementares: reacção do catalisador com HD, resultando, após nova permuta com o solvente, a libertação de deutério. A dependência de pH desta reacção pode ser explicada com base neste mecanismo: a valores de pH ácido o passo lento da reacção é a cisão heterolítica, pois o

grupo básico encontra-se protonado; a pH básico, o passo lento será a reformação de H_2 , por o grupo básico estar essencialmente desprotonado. Assim, a velocidade máxima da reacção ocorre a um valor de pH intermédio.

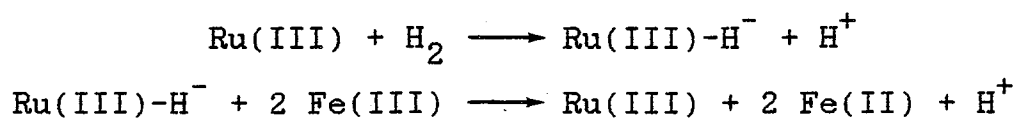
Os autores analisaram também teoricamente o modo de adição da molécula de hidrogénio, concluindo que o composto deve ser pentacoordenado de modo a que a orbital antiligante da molécula de H_2 interactue eficientemente com a orbital de mais alta energia do metal (d_{z^2}). O ligando axial, que neste caso é o solvente, teria como função elevar a energia desta orbital.

II.3.3-Cloreto de ruténio

Halpern e James (56) estudaram a redução dos iões $Fe(III)$ ou $Ru(IV)$ em solução aquosa na presença de hidrogénio, catalisada por cloreto de ruténio(III):

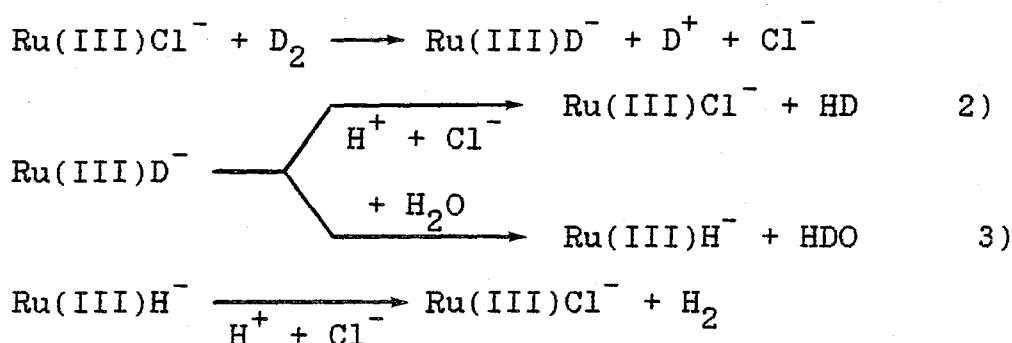


A activação de hidrogénio dá-se por cisão heterolítica da molécula de H_2 , tendo sido proposto o seguinte mecanismo:



Na ausência de $Fe(III)$ não há consumo de hidrogénio, o que sugere que a primeira reacção é reversível. Estudando-se a reacção de permuta D_2/H_2O os autores verificaram que na fase gasosa a concentração inicial de HD é superior à de H_2 , o que é compatível com o mecanismo heterolítico. A razão HD/H_2 diminui com o aumento da concentração de $Ru(III)$, o que reflecte possivelmente a con-

tribuição de múltiplos processos de permuta, isto é, uma molécula de HD, resultante da primeira reacção de permuta entre D_2 e H_2O , sofre uma segunda reacção de permuta formando H_2 , antes de se libertar para a fase gasosa. Extrapolando os resultados para uma concentração nula de $Ru(III)$ obtém-se um valor de $HD/H_2 = 0,3$, que corresponde provavelmente à distribuição primária de produtos. Esta razão é, também, dependente do pH do meio, aumentando com o seu acréscimo. O mecanismo proposto para a reacção de permuta é o seguinte:



A distribuição dos produtos de permuta primária é determinada por competição entre os passos 2) e 3), ou seja, a razão HD/H_2 é directamente proporcional ao valor da concentração de H^+ e à razão entre as constantes de velocidade k_2 e k_3 :

$$HD/H_2 \propto [H^+]. k_2/k_3$$

Este sistema foi apresentado neste capítulo de compostos de níquel porque, embora o Ruténio(III) tenha uma configuração electrónica diferente do ião níquel(III) e, assim, não ser possível extrapolar os resultados obtidos nos compostos de $Ru(III)$ para compostos de $Ni(III)$, o sistema apresenta várias características importantes para a discussão do mecanismo de activação de hidrogénio pela hidrogenase (ver capítulo IV):

- a cisão da molécula de H_2 dá-se pelo modo heterolítico;
- verifica-se que a razão das velocidades de formação dos produtos primários de permuta (HD e H_2) é função da concentração de catalisador e do pH do meio reaccional;

II.3.4-Hidretos de Niquel (57-64)

Outros sistemas interessantes do ponto de vista da função dos centros metálicos da hidrogenase são os complexos hidreto de metais de transição. Estes complexos têm sido considerados como a espécie cataliticamente activa em reacções de hidrogenação e isomerização de olefinas, sendo conhecidos exemplos de praticamente todos os metais de transição.

Dispõe-se ainda de poucos dados termodinâmicos que permitam prever a estabilidade de hidretos, ou seja, no caso concreto da enzima hidrogenase, contendo centros de ferro e níquel, não se pode prever qual dos iões metálicos reagirá preferencialmente, em termos energéticos, com a molécula de hidrogénio. Contudo, vários complexos de níquel, em geral com ligandos aceitadores π , têm-se revelado extremamente activos como catalisadores de reacções de hidrogenação, o que sugere uma elevada reactividade daquele metal em relação á molécula de H_2 .

O ião hidreto é um ligando bastante forte, estando perto dos grupos alquilo, arilo e cianeto na série espectroquímica. Por isso, os complexos hidreto envolvem geralmente ligandos com elevada capacidade de aceitação π , como o grupo carbonilo, fosfinas e tiolatos. Têm sido isolados alguns hidretos de níquel, no estado de oxidação $Ni(II)$, com ligandos deste tipo, em geral em complexos com geometria quadrangular plana ou pirâmide quadran-

gular. Não têm sido referidos na literatura complexos hidreto com o ião Ni(III); no entanto, nos estudos que têm sido realizados não se tem determinado o estado de oxidação da espécie complexa cataliticamente activa.

I.4-Referências

- 1)-R.M.Thauer, G.Diekert and P.Schonheit, (1980), Trends. Biochem. Soc., 11, 304-306
- 2)-A.J.Thomson, (1982), Nature (London), 298, 602-603
- 3)-D.Eskew, R.M. Welch and E.E.Cary, (1983), Science, 222, 621-623
- 4)-R.M.Welch, (1981), J.Plant Nutr., 3, 345-356
- 5)-N.E.Dixon, C.Gazzola, R.C.Blakeley, and B.Zerner, (1975), J. Am. Chem. Soc., 97, 413-416
- 6)-S.S.Hasnain and B.Piggott, (1983), Biochem. Biophys. Res. Comm. 112, 279-283
- 7)-N.E.Dixon, C.Gazzola, R.C.Blakeley and B.Zerner, (1976), Science, 191, 1144-1150
- 8)-S.Ragsdale, L.G.Ljungdahl and D.V.DerVartanian, (1983), Biochem. Biophys. Res. Comm., 115, 658-665
- 9)-S.Ragsdale, J.E.Clark, L.G.Ljungdahl, L.Lundie, and H.D.Drake, (1983), J. Biol. Chem., 258, 2364-2369
- 10)-S.Ragsdale, L.G.Ljungdahl and D.V.DerVartanian (1983), J. Bacteriol., 155, 1124-1237
- 11)-H.D.Drake, S.Hu and H.Wood, (1980), J. Biol. Chem., 255, 7174-
- 12)-S.W.Ragsdale, H.G.Wood and W.E.Antholine (1985), submetido para publicação.
- 13)-I.Moura, J.J.G.Moura, H.Santos, A.V.Xavier, G.Burch,

- H.D.Peck, Jr. and J.LeGall, (1983), *Biochim.Biophys.Acta*, 742, 84-90
- 14)-G.Diekert, G., Klee, B. e Thauer, R.K., (1980), *Arch.Microbiol.*, 124, 103-106
- 15)-W.Elleperon, W.Whitman, and R.Wolfe, (1984), *Proc.Nat.Acad.Sci.*, 75, 3707-3710
- 16)-H.Gilles and R.K.Thauer, (1983), *Eur.J.Biochem.*, 285, 109-112
- 17)-J.T.Keltjens, C.G.Caerteling, A.M.van Kooten, H.F.van Dijk, and G.D.Vogels, (1983), *Biochim.Biophys.Acta*, 743, 351-358
- 18)-A.K.Shiemke, L.D.Eirich and T.M.Loehr, (1983), *Biochim.Biophys.Acta*, 748, 143-147
- 19)-R.A.Scott, P.L.Hartzell, R.S.Wolfe, J.LeGall and S.P.Cramer, (1985),
- 20)-R.P.Hausinger, W.H.Orme-Johnson, and C.Walsh, (1984), *Biochem.*, 23, 801-804
- 21)-D.Nicholls, (1973), in *Comprehensive Inorganic Chemistry*, Cap.42, Vol.III, J.Bailur, H.Emel us, R.Nyholm e A.Dickenson, Eds, Pergamon Press
- 22)-A.A.G.Tomlinson, (1981), *Coord.Chem.Rev.*, 37, 221-296
- 23)-F.A.Cotton and G.Wilkinson, (1972), *Advanced Inorganic Chemistry*, pp 892 - 903 , John Wiley, USA
- 24)-D.Buckingham, (1973), in *Inorganic Biochemistry*, Vol.I, Cap.I, Eickhorn, G.L., Ed., Elsevier, Amsterdam
- 25)-K.Nag and A.Chakravorty, (1980), *Coord.Chem.Rev.*, 33, 87-147
- 26)-H.C.Freeman, (1973), in *Inorganic Biochemistry*, Vol.I, Cap.IV, Eickhorn, G.L., Ed. Elsevier, Amsterdam
- 27)-L.Lovecchio, E.Gore and D.Busch, (1974), *J.Am.Chem.Soc.*, 96, 3109-3121
- 28)-L.Sabatini and L.Fabbrizzi, (1979), *Inorg.Chem.*, 18, 458-444

- 29)-L.Fabbrizzi, (1979), Inor.Chim.Acta, 36,C391-C393
- 30)-T.Sakurai, J.Hongo, A.Nakahara and Y.Nakao, (1980), Inorg. Chim.Acta, 46,205-210
- 31)-F.P.Bossu, C.Murray and D.W.Margerum, (1978), Inorg.Chem.,17, 1630-1638
- 32)-G.Bowmaker, P.D.W.Boyd and G.K.Campbell, (1983),Inorg.Chem., 22, 1208-1213
- 33)-Y.Sugiura and Y.Mino, (1979), Inorg.Chem., 18, 1336-
- 34)-N.Jubran, G.Ginzberg, H.Cohen and D.Meyerstein, (1982),J. Chem.Soc.Chem.Comm., 512-515
- 35)-T.E.Mines, e W.E.Geiger, (1973), Inorg.Chem., 12, 1189-
- 36)-G.Bowmaker, P.D.W.Boyd, G.K.Campbell, J.M.Hope and R.L. Martin, (1982), Inorg.Chem., 21, 1152-1159
- 37)-D.Busch, (1978), Acc.Chem.Res., 11, 342-
- 38)-M.Rakowsti, M.Rycheck and D.Busch, (1975), Inorg.Chem,14, 1194-1199
- 39)-G.Zeigerson, I.Bar, J.Bernstein, L.Kirschenbaum and D. Meyerstein, (1982), Inorg.Chem., 21, 73-80
- 40)-Y.Sugiura, J.Kawashara and T.Suzuki, (1983), 115, 878-881
- 41)-A.Lappin, C.Murray and D.W.Margerum, (1978), 17, 1630-1638
- 42)-R.D.António, (1985), Tese de Doutoramento, IST, Lisboa
- 43)-F.P.Bossu, E.B.Paniago, D.W.Margerum, S.T.Kirksey, Jr., and J.L.Kurtz, (1978), Inorg.Chem., 17, 1034-1042
- 44)-N.Jubran, G.Ginzburg, H.Cohen, Y.Koresh and D.Meyerstein, (1985), Inorg.Chem., 24, 251-258
- 45)-S.I.Siiupack, E.Billig, R.J.H.Clark, R.Williams and H.B.Gray (1964), J.Am.Chem.Soc. 86, 4594-4602
- 46)-E.I.Stiefel, J.H.Waters, E.Billig and H.B.Gray, (1965), J.Am.

Chem.Soc., 87, 3016-3017

47)-J.Lati, J.Koresh and D.Meyerstein, (1975), Chem.Phys.Lett., 33, 286-288

48)-G.M.Grove, G. van Koten, Rob Zoet, N.W.Murrall and A.J.Welch, (1983), J.Am.Chem.Soc., 105, 1379-1380

49)-A.H.Maki, N.Edelstein, A.Davison and R.H.Holm, (1964), J.Am. Chem. Soc., 86, 4580-4587

50)-R.K.Brown, T.J.Bergendahl, J.S.Wood and J.H.Waters, (1983), Inorg.Chim.Acta, 68, 79-85

51)-M.Divaira, S.Midollini and L.Sacconi, (1977), Inorg.Chem., 16, 1518-1524

52)-S.Alvarez and R.Hoffmann, (1986), J.Am.Chem.Soc., in press

53)-A.Vlcek, Jr. and A.A.Vlcek, (1980), Inorg.Chim.Acta, 41, 123-131

54)-E.Hantzopoulos, J.Konstantatos, E.Vrachnou-Astra and D.Katakis, (1985), J.Mol.Cat., 31, 327-333

55)-H.Olivé and S.Olivé, (1975), J.Mol.Cat., 1, 121-125

56)-J.Halpern and B.R.James, (1966), Can.J.Chem., 44, 671-675

57)-P.Rigo, M.Brenas and M.Busato, (1979), Inorg.Chem, 18, 860-

58)-B.R.James, (1982), in Comprehensive Organometallic Chemistry, Vol. VIII, Cap. 51, Wilkinson, G., Ed., Pergamon Press, USA

59)-J.G.Green and M.L.H.Green, (1973), in Ref.21), Vol. IV, Cap. 48

60)-H.Kaerz and R.B.Saillant, (1972), Chem.Rev., 72, 231-

61)-P.W.Jolly, (1982), in Ref. 58), Vol. I, Cap. 37-4

62)-P.W.Jolly, (1982), in Ref. 58), Vol. VIII, Cap. 56-2

63)-R.A.Schunn, (1970), Inorg.Chem., 9, 394-395

64)-L.Sacconi, A.Orlandini and S.Midollini, (1974), Inorg.Chem.,

13, 2850-2856

65)-P.W.Jolly and G.Wilke (1974), Organic Chemistry of Nickel,
Vol.I, Academic Press

66)-A.Scott, S.Wallin, M.Czechowski, D.V.DerVartanian, J.LeGall,
H.H.Peck, Jr. and I.Moura, (1984), J.Am.Chem. Soc., 106, 6864-
6865

67)- P.A. Lindahl, N.Kojima, R.P Hausinger, J.A.Fox, B.K.Teo,
C.T.Walsh and W.H.Orme-Johnson, (1984), J.Am.Chem.Soc., 106,
3062-3064

CAPÍTULO III:

- PROPRIEDADES GERAIS DE
CENTROS FERRO-ENXOFRE

Embora todas as hidrogenases [NiFe] até agora caracterizadas apresentem, uma grande diversidade em relação à composição dos seus centros activos, todas elas têm uma característica comum : contêm sempre centros ferro-enxofre com as estruturas básicas [2Fe-2S], [3Fe-xS] e [4Fe-4S] (1,2). O estudo e conhecimento das propriedades destes centros em proteínas simples tem sido determinante para a caracterização de proteínas Fe-S complexas , pelo que serão descritas sucintamente as principais características destes centros em ferredoxinas, nomeadamente as suas propriedades espectroscópicas de Ressonância Paramagnética Electrónica e de Mössbauer. Dar-se-á particular relevância a centros do tipo [3Fe-xS] e [4Fe-4S], visto que as hidrogenases caracterizadas neste trabalho contêm centros Fe/S apenas destes tipos.

III.1-Composição e Estrutura (3-6)

As ferredoxinas são proteínas contendo ferro não hémico coordenado a átomos de enxofre através de resíduos cisteína da cadeia polipeptídica e a iões sulfureto, vulgarmente designados por enxofre lábil ou inorgânico. As estruturas básicas destes centros encontram-se na figura III.1.

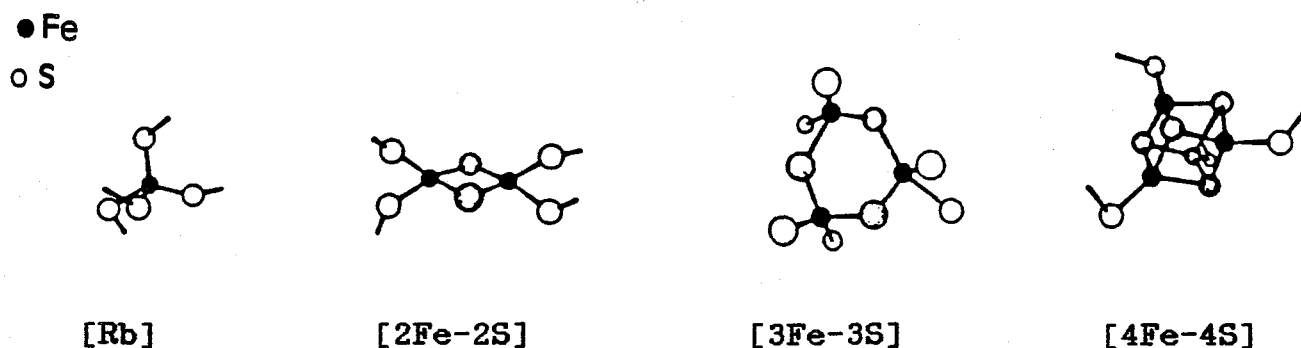


Figura III.1: Estruturas básicas de centros Fe/S (3,4)

Os íons ferro encontram-se coordenados ao enxofre numa geometria aproximadamente tetraédrica. A unidade mais simples, presente em rubredoxinas e na desulforedoxina de *D.gigas* (3), contém apenas um íon ferro ligado a quatro átomos de enxofre de resíduos cisteína. Nas restantes unidades os íons ferro são ligados entre si através de íons sulfureto e os agregados assim constituídos ligam-se à cadeia polipeptídica pelo átomo de enxofre dos resíduos cisteína. O núcleo $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ forma um anel de quatro átomos, planar. A distância Fe-Fe é de cerca de 0,27 nm. O agregado $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ pode ser visualizado como consistindo em dois tetraedros interpenetrantes, contendo quatro íons de ferro e quatro íons de enxofre lábil; a estrutura deste centro é assimétrica, ocorrendo uma distorção tetragonal. A estrutura dos centros $[3\text{Fe}-x\text{S}]$ é ainda polémica, havendo poucos dados disponíveis: apenas a Fd I de *Azotobacter vinelandii* foi estudada por Raios-X, enquanto a Fd II de *D.gigas* e a aconitase foram estudadas por EXAFS (5,6). Os resultados obtidos têm sido interpretados como indicativos da existência de dois tipos de centros $[3\text{Fe}-x\text{S}]$ (4): um tipo, representado pela Fd I de *A.vinelandii*, em que a estequiometria é $3\text{Fe}:3\text{S}$, tendo o agregado uma estrutura tipo barco distorcido, com o anel $[3\text{Fe}-3\text{S}]$ numa conformação quase planar (Figura III.1); - o outro tipo de centro é representado pela Fd II de *D.gigas* e pela aconitase, no qual a estequiometria do núcleo Fe/S é $3\text{Fe}:4\text{S}$ (Figura III.2). Neste centro as distâncias Fe-S e Fe-Fe são semelhantes às dos centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ e $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, apontando para uma conformação do tipo cadeira para o anel $[3\text{Fe}-4\text{S}]$. Foram sugeridas duas possíveis estruturas para o centro $[3\text{Fe}-4\text{S}]$ (Figura III.2) (4): a estrutura A resulta de um centro

[4Fe-4S] ao qual foi retirado um átomo de ferro, gerando-se um tiolato livre. A estrutura B pressupõe a manutenção de quatro ligandos cisteína, levando à existência de dois tipos de coordenação dos íons ferro; nesta estrutura existe um núcleo [2Fe-2S] que poderá explicar a conversão [3Fe-4S] --- [2Fe-2S] que ocorre em reacções de extrusão destes centros (ver discussão adiante).

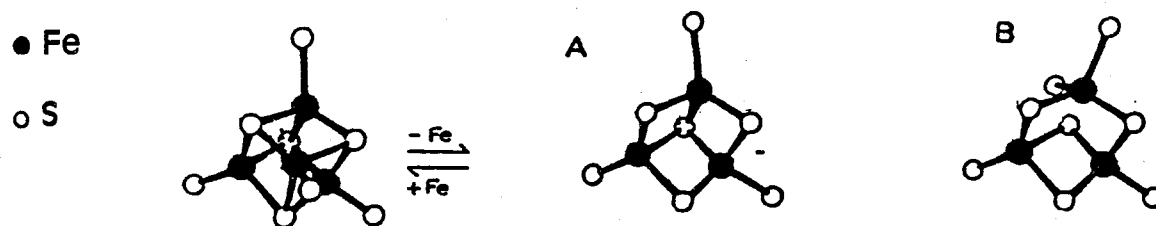


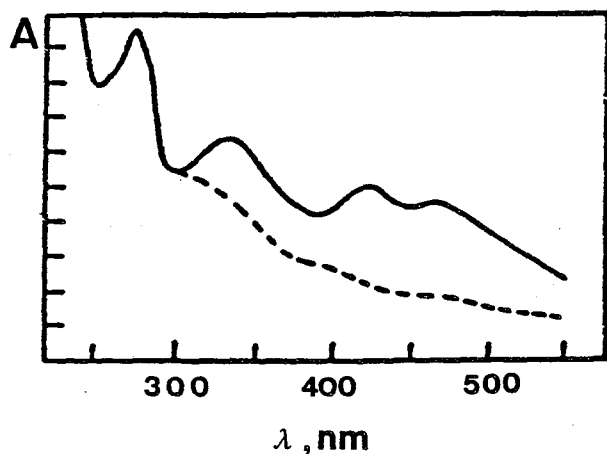
Figura III.2: Estruturas alternativas para centros [3Fe-4S] (4)

Devido à incerteza na estequiometria dos centros contendo três íons ferro, com a possível exceção da aconitase e da Fd II de *D.gigas*, estes centros serão representados como [3Fe-xS].

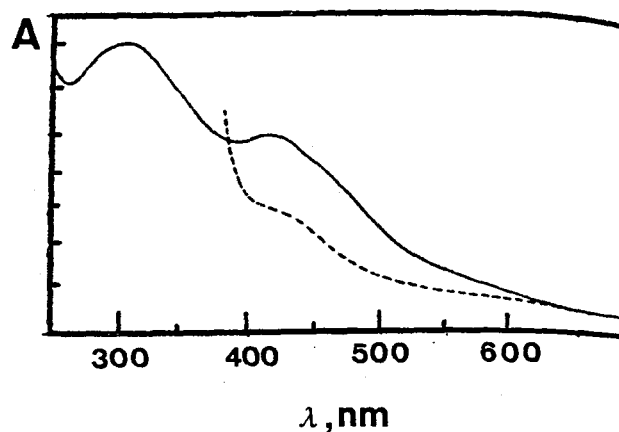
III.2-Espectroscopia de visível e ultravioleta (7,8)

Os espectros de visível e ultravioleta de proteínas contendo centros Fe/S apresentam geralmente uma banda alargada com um máximo mal definido a cerca de 400 nm, resultante de bandas de transferência de carga S⁻-Fe (Figura III.3).

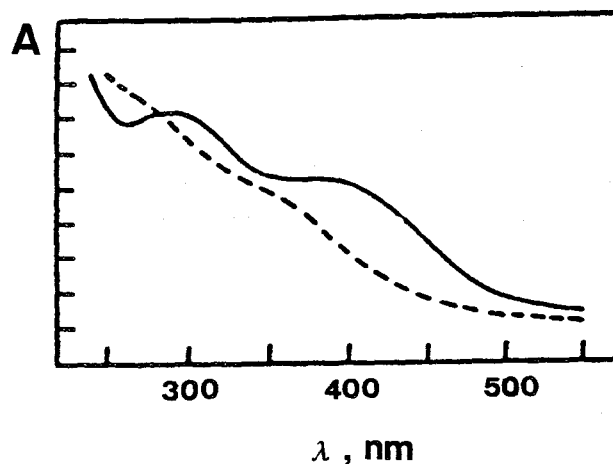
O espectro é característico de cada tipo de centro mas, devido à sua forma alargada, é difícil a identificação destes agregados em proteínas complexas, apenas a partir de espectros de visível/UV. Em geral, a absorvidade molar por cada íon ferro é de cerca de $4,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Por redução, a absorvância diminui



Ferredoxina [2Fe-2S]



Ferredoxina [3Fe-4S]



Ferredoxina [4Fe-4S]

Figura III.3: Espectros de Vis/UV de proteínas contendo centros Fe/S (9)
Formas oxidada (—) e reduzida (-----)

cerca de 50% no ponto de máxima diferença. Como a cadeia polipeptídica não absorve significativamente na região do visível, a razão de absorvâncias A_{400}/A_{280} é utilizada como um indicador da proporção relativa cromóforo/peptídeo, sendo usada como estimativa do grau de pureza de proteínas contendo este tipo de centros.

III.3-Transições redox de centros Fe/S (3,8,10,11)

Os centros Fe/S podem apresentar diversos estados de oxidação, interrelacionados por reacções de transferência monoelétricas (Tabela III.1 e Figura III.4):



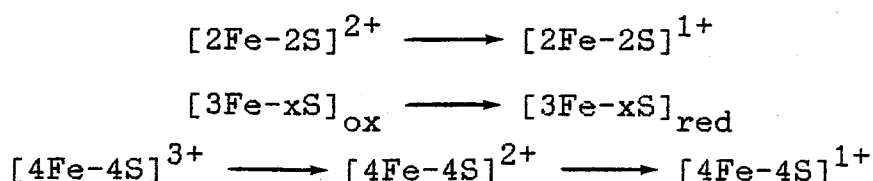


TABELA III.1: Estados de oxidação de centros Fe/S^(a)

Centro	Valência dos átomos de Fe	Estado de oxidação	Estado magnético	Transições típicas em proteínas
[Rb]	Fe ³⁺	3 ⁺	S=5/2	Rbox (nativo)
	Fe ²⁺	2 ⁺	S=2	Rbred
[2Fe-2S]	Fe ³⁺ , Fe ³⁺	2 ⁺	S=0	Fd _{ox} (nativo)
	Fe ³⁺ , Fe ²⁺	1 ⁺	S=1/2	Fd _{red}
[3Fe-xS]	3 Fe ³⁺	1 ⁺ (b) 3 ⁺ (c)	S=1/2	Fd _{ox} (nativo)
	2Fe ^{+2,5} , Fe ³⁺	0 2 ⁺	S=2	Fd _{red}
[4Fe-4S]	3 Fe ³⁺ , Fe ²⁺	3 ⁺	S=1/2	HIPIP _{ox}
	2 Fe ³⁺ , 2 Fe ²⁺	2 ⁺	S=0	HIPIP _{red} Fd _{ox} (nativo)
	Fe ³⁺ , 3 Fe ²⁺	1 ⁺	S=1/2	Fd _{red}

(a) O estado de oxidação formal dos agregados [Fe-S] é determinado somando as cargas formais dos íons ferro e sulfureto. A carga formal para os centros [3Fe-xS] depende do número de íons S⁼ : (b) x=4; (c) x=3. Adaptada ref. (3,10)

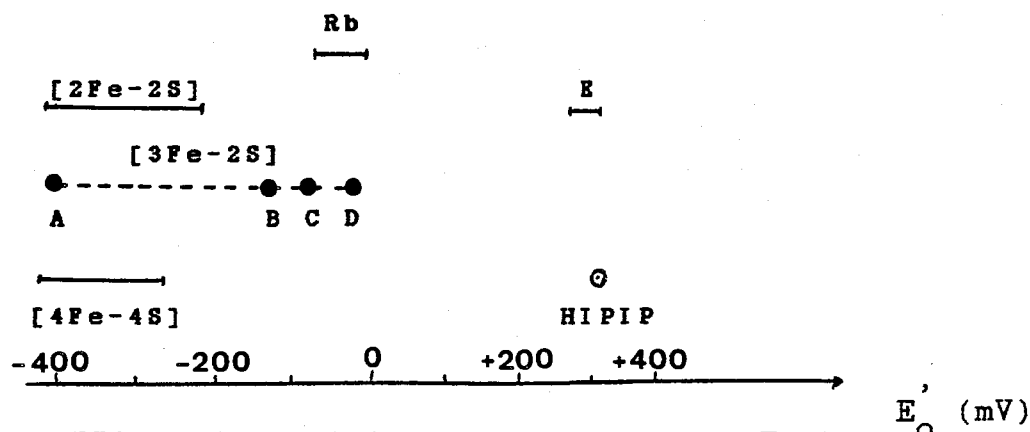


Figura III.4: Potenciais redox de centros Fe/S
 A- Fd I de *A.vinelandii*; B- Fd II de *D.gigas*
 C- Hidrogenase de *D.gigas*; D- Fd I de *D.gigas*
 E- Centros "Rieske" . Adaptada Ref. (3,12-14)

As proteínas do tipo rubredoxina apresentam potenciais redox numa gama estreita, perto de 0 mV. Podem existir em dois estados redox: estado nativo, oxidado, com $S=5/2$ (Fe^{3+}) e estado reduzido, com $S=2$ (Fe^{2+}). Pelo contrário, todos os outros tipos de centro apresentam potenciais redox cobrindo uma gama de potenciais bastante mais larga e constituem exemplos de compostos polinucleares de valência mista, contendo iões ferro em diferentes estados de oxidação formal.

- A redução dos centros $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ ocorre entre -220 e -450 mV, com excepção dos centros tipo "Rieske", que apresentam potenciais redox positivos (15); esta diferença parece resultar de uma coordenação diferente de um átomo de ferro, que não estará coordenado a cisteínas, mas sim a ligandos azotados ou oxigenados (15). Os centros $[2\text{Fe}-x\text{S}]$ são isolados no estado oxidado ($S=0$); por redução forma-se um estado paramagnético, com $S=1/2$.

- Os centros $[3\text{Fe}-x\text{S}]$ são também isolados no estado oxidado, com $S=1/2$. A sua redução ocorre a potenciais negativos, entre cerca de -30 e -400 mV, atingindo-se um estado paramagnético com $S=2$. Os dados disponíveis não permitem ainda relacionar as diferenças de potencial redox com a estrutura do centro. A carga total destes agregados depende do número de iões sulfureto presentes que, como já referido, permanece na maioria das proteínas incerto. Assim, os estados oxidado e reduzido serão representados por índices ox e red, respectivamente.

- De acordo com a hipótese dos três estados, de Carter et al (11), os centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ podem existir em três estados de oxidação (3^+ , 2^+ e 1^+). As proteínas do tipo HIPIP (High Potencial Iron Protein) contêm centros que podem apresentar os estados 3^+ ,

paramagnético, com $S=1/2$, ou 2^+ , diamagnético, com $S=0$; a transição entre estes dois estados dá-se a potenciais positivos. Outras ferredoxinas contêm centros que apresentam o estado 2^+ quando isoladas (semelhante ao estado 2^+ de HIPIP) que, por redução a potenciais negativos, se transformam no estado 1^+ , com $S=1/2$. Têm-se assim dois tipos de centros $[4Fe-4S]$: centros $[4Fe-4S]^{3+/2+}$ e centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$. Por redução da proteína HIPIP de *Ch. vinosum*, a cerca de -600 mV e na presença de DMSO, foi obtido o estado 1^+ para esta proteína, confirmando-se parcialmente a hipótese dos três estados. No entanto, a oxidação de centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ leva à destruição do agregado, por conversão em centros do tipo $[3Fe-xS]$ ou por oxidação dos ligandos cisteína, com formação de radicais disulfureto (16,17), não tendo sido obtido ainda o estado 3^+ para estes centros, o que contraria aquela hipótese.

A diversidade de potenciais redox para centros do mesmo tipo evidencia a influência da cadeia polipeptídica nos centros metálicos das proteínas Fe/S, tal como acontece também para outros tipos de proteínas, como por exemplo as proteínas hêmicas (3). Esta influência é particularmente nitida no caso de proteínas contendo centros $[4Fe-4S]$: embora a estrutura básica destes centros seja semelhante, nas proteínas HIPIP os centros funcionam apenas entre os estados 3^+ e 2^+ , enquanto noutras proteínas funcionam apenas entre estados 2^+ e 1^+ .

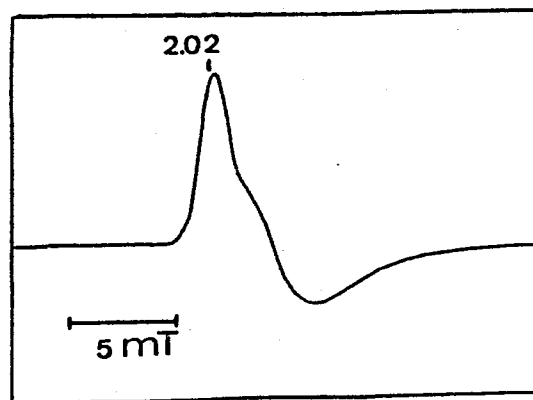
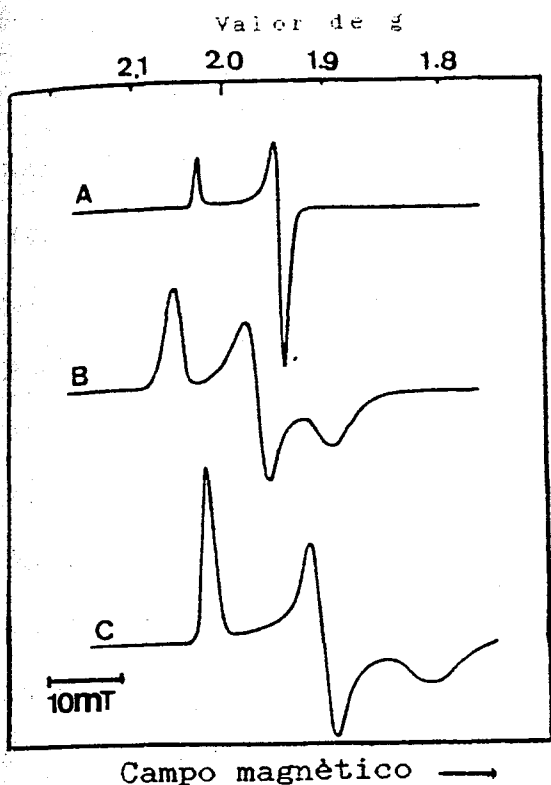
III.4-Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica

A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE) tem sido utilizada como técnica básica para a identificação

de centros Fe/S (8,9). Na figura III.5 mostram-se exemplos de espectros de RPE para centros [2Fe-2S], [3Fe-xS] e [4Fe-4S].

No estado oxidado, os centros [2Fe-2S] são diamagnéticos, pelo que não apresentam sinal de RPE. O estado reduzido é paramagnético, $S=1/2$, surgindo sinais de RPE típicos, com $g_m=1,94$ (Tabela III.2 e Figura III.5). Estes sinais podem ser rômnicos (ferredoxinas tipo planta) ou axiais (adrenoxina, ferredoxinas bacterianas e hidrogenases). Os sinais são em geral detectados até temperaturas cerca de 77 K; os sinais rômnicos apresentam uma relaxação mais rápida que os sinais axiais. O sinal de RPE do centro Rieske de *T.thermophilus*, no estado reduzido, é peculiar, com $g_m=1,85$. Esta diferença resulta possivelmente da coordenação dos iões ferro neste centro, como referido anteriormente (15).

Os centros [3Fe-xS] no estado oxidado são paramagnéticos, com $S=1/2$, revelando sinais de RPE praticamente isotrópicos, centrados a $g=2,0$ (Figura III.5 e Tabela III.2), observáveis até cerca de 30 K. Os sinais de RPE de centros deste tipo encontrados em hidrogenases são ligeiramente diferentes (mais isotrópicos) que os sinais de ferredoxinas com estes agregados (12,18,20). No estado reduzido, os centros [3Fe-xS] são também paramagnéticos, com $S=2$, sendo em geral silenciosos em RPE. Hagen et al (21) detectaram numa ferredoxina de *T.thermophilus* um sinal de RPE a $g=12$, que atribuíram a centros [3Fe-xS] neste estado de redução. Na hidrogenase de *D.gigas*, que contém um centro [3Fe-xS], é também observado um sinal áquele valor de g , em certos estados de redução (22).



Campo magnético →

Centros $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ reduzidos

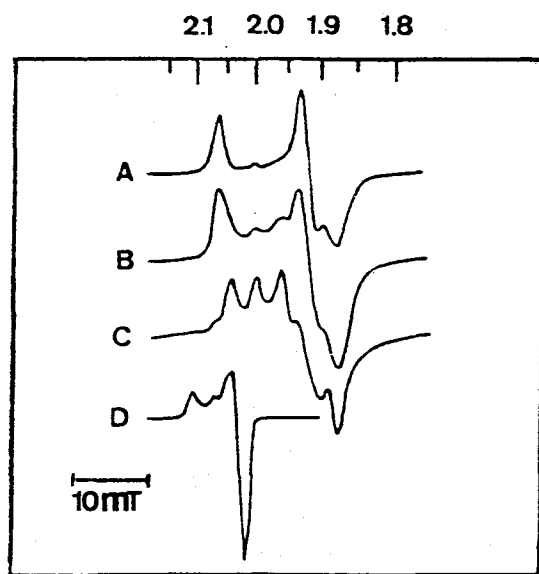
A- Adrenoxina, $T = 20 \text{ K}$

B- Fd de espinafre, $T = 20 \text{ K}$

C- Centro "Rieske" de *T. Ther-mophilus*, $T = 25 \text{ K}$

Centro $[3\text{Fe}-\text{xS}]$ oxidado

Fd II de *D. gigas*, $T = 4,2 \text{ K}$



Campo magnético →

Centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, $T = 20 \text{ K}$

A-C - centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/1+}$ reduzidos

A- Fd de *B. stearothermophilus*

B- Fd *C. pasteurianum* semi reduzida

C- Fd *C. pasteurianum* totalmente reduzida

D- Centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{3+/2+}$: HIPIP de *Chromatium*, oxidada

Figura III.5: Espectros de RPE de centros Fe/S (9,12)

TABELA III.2: Sinais de RPE típicos de centros Fe/S

Tipo de centro (origem)	Valor de g			
	g_m	g_{max}	g_{med}	g_{min}
[2Fe-2S]¹⁺				
Adrenoxina	1,96	2,02	1,93	1,92
Fd (espinafre)	1,96	2,04	1,96	1,89
Centro "Rieske" (<i>T.thermophilus</i>)	1,90	2,02	1,90	1,80
[3Fe-xS]_{ox}				
Fd II (<i>D.gigas</i>)	2,00	2,02	2,00	1,97
Aconitase (coração de boi)	2,01	--	--	--
Hidrogenase (<i>D.gigas</i>)	2,01	2,02	2,01	2,00
[4Fe-4S]³⁺				
Fd HIPIF (<i>Ch.vinosum</i>)	2,06	2,10	2,10	2,04
[4Fe-4S]¹⁺				
Fd (<i>B.polimyxa</i>)	1,95	2,06	1,92	1,88
Hidrogenase (<i>Ms.barkeri</i>)	1,93	2,04	1,90	1,86

Adaptada Ref (8,9,26)

- Os centros [4Fe-4S] no estado 2⁺ são diamagnéticos (S=0). No estado reduzido, 1⁺, apresentam em geral sinais rômnicos, com $g_m=1,96$, correspondentes a um sistema de spin com S=1/2, detectáveis até cerca de 35 K (Figura III.5 e Tabela III.2). Em proteínas com mais de um centro [4Fe-4S] os espectros no estado reduzido podem apresentar características um pouco diferentes, quer por alteração das propriedades de relaxação de cada centro, quer por interacção magnética entre os centros. Por exemplo, a ferredoxina de *Clostridium pasteurianum*, que contém dois centros [4Fe-4S]^{2+/1+}, apresenta no estado semi-reduzido um sinal de RPE simples, com $g_m=1,96$, típico de centros [4Fe-4S]¹⁺ (Figura III.5). No estado completamente reduzido, o espectro de RPE é

bastante mais complexo, tendo sido interpretado como resultando de um acoplamento de spin entre os dois agregados $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ paramagnéticos, com $S=1/2$ (23). Lindahl et al (24) detectaram na proteína Fe reduzida da nitrogenase de *Azotobacter vinelandii* um sinal de RPE a $g=5,8$ e $5,15$ que atribuíram a um centro $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ com um estado de spin $S=3/2$. Estes autores verificaram ainda que o estado de spin destes centro é sensível à conformação da proteína. Assim, em etilenoglicol a 50%, cerca de 90% dos centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ encontra-se na forma com $S=1/2$, enquanto na presença de ureia a 0,4% aproximadamente 85 % dos centros encontra-se no estado com $S=3/2$. Estes resultados permitiram explicar porque razão a quantificação de spin do sinal a $g=1,94$ desta proteína no estado reduzido era sempre inferior a um spin por centro: em condições normais, parte dos centros encontra-se no estado com $S=3/2$, pelo que a quantificação traduzia apenas os centros com $S=1/2$. Moulis et al (25) observaram igualmente estados de spin com $S>1/2$ na ferredoxina de *C.pasteurianum* em que os átomos de enxofre lábil foram substituídos por selênio, obtendo-se centros $[4\text{Fe-4Se}]^{2+/1+}$, detectando sinais de RPE a $g=4,5$, $3,5$ e ~ 2 e a $g=5,17$, que correspondem a agregados com $S=7/2$ e $S=3/2$. Verifica-se assim que centros $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ podem não apresentar no estado reduzido os sinais de RPE típicos com $g_m=1,94$, associados a sistemas de $S=1/2$.

Os centros do tipo HIPIP no estado oxidado ($[4\text{Fe-4S}]^{3+}$, $S=1/2$) apresentam sinais de RPE axiais com $g_m=2,05$, observáveis a baixa temperatura (Figura III.5), enquanto no estado reduzido ($[4\text{Fe-4S}]^{2+}$) são diamagnéticos.

III.5-Espectroscopia de Mössbauer (3,27,28)

A espectroscopia de Mössbauer, em conjunto com a espectroscopia de RPE, tem sido determinante no estudo de centros Fe/S. Devido à detecção de todos os íons ferro na amostra, independentemente do seu estado de spin, esta espectroscopia permite o estudo das proteínas contendo centros deste tipo em qualquer estado de oxidação, constituindo a técnica de excelência para o estudo de proteínas de ferro. Os parâmetros básicos da espectroscopia de Mössbauer (desvio isomérico, δ , e desdobramento de quadrupolo, ΔE_Q) são característicos do estado de oxidação de cada íon ferro. Por outro lado, a forma do espectro de Mössbauer e, em particular, a sua dependência com o campo magnético aplicado permitem determinar o estado de spin dos sistemas detectados. Nomeadamente, é possível a distinção de sistemas diamagnéticos e paramagnéticos e, entre estes, distinguir centros com spin total inteiro (sistemas não Kramer) de centros com spin total semi inteiro (sistemas de Kramer) (ver Apêndice). Na figura III.6 mostram-se alguns espectros de Mössbauer típicos de cada centro Fe/S. Na tabela III.3 apresentam-se os parâmetros de Mössbauer para estes centros.

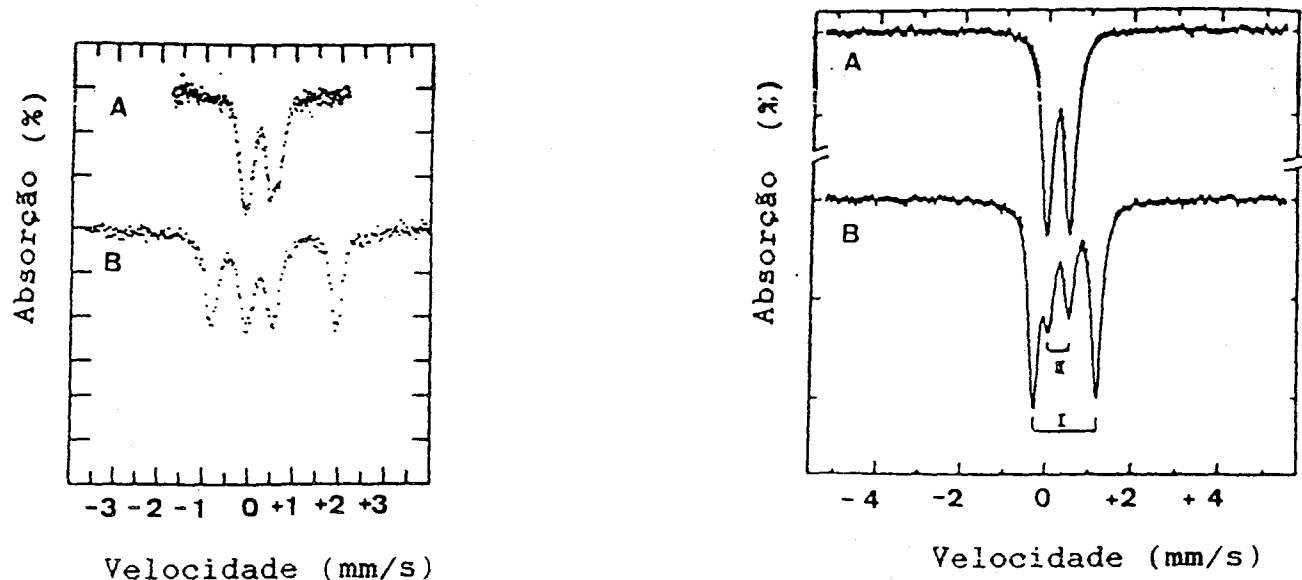
- Centros do tipo [Rb] : Na forma oxidada, a 4,2 K, o espectro de Mössbauer, magnético, é característico de íons Fe^{3+} de spin elevado ($S=5/2$), coordenado tetraedricamente a átomos de enxofre. A alta temperatura o espectro colapsa num dobleto de quadrupolo, com $\delta = 0,28$ mm/s e $\Delta E_Q = 0,64$ mm/s. No estado reduzido o espectro consiste, na ausência de campo magnético aplicado, num dobleto de quadrupolo, com $\Delta E_Q = 3,3$ mm/s e $\delta = 0,65$ mm/s, característicos de íons Fe^{2+} também coordenado tetraedricamente a

ligandos de enxofre. As propriedades magnéticas deste espectro são típicas de sistemas com spin inteiro ($S=2$).

- Centros $[2\text{Fe}-2\text{S}]$: O espectro de Mössbauer do estado oxidado é diamagnético, consistindo num dobleto de quadrupolo com desvio isomérico de $0,22 - 0,29$ mm/s e desdobramento de quadrupolo ΔE_Q de $0,60-0,66$ mm/s, característico de iões Fe^{3+} . O diamagnetismo do sistema indica acoplamento antiferromagnético entre os átomos de ferro, resultando num sistema com $S=0$. Por redução, observam-se a alta temperatura dois dobletos de quadrupolo, um com parâmetros idênticos ao do estado oxidado e outro com parâmetros típicos de iões Fe^{2+} , o que mostra que no estado reduzido os agregados $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ são compostos de valência mista, contendo um ião Fe^{3+} e um ião Fe^{2+} . Estudos de dependência do espectro com o campo magnético externo indicam acoplamento antiferromagnético entre os iões ferro.

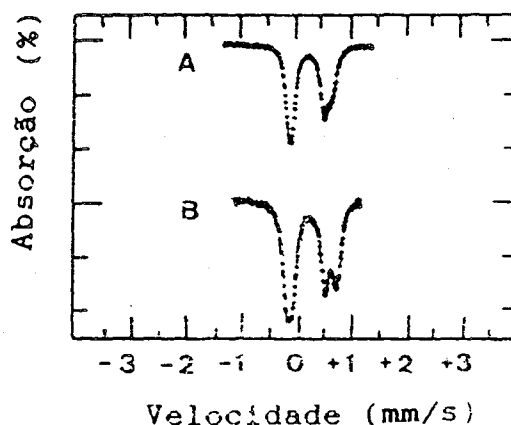
- Centros $[3\text{Fe}-x\text{S}]$: A forma oxidada da Ferredoxina II de *D.gigas* apresenta um espectro de Mössbauer magnético a $4,2$ K, com três sítios de ferro distintos. A 77 K, os três componentes colapsam num dobleto de quadrupolo, com desvio isomérico ($\delta = 0,27$ mm/s) e desdobramento de quadrupolo ($\Delta E_Q = 0,54$ mm/s), típicos de iões Fe^{3+} coordenados tetraedricamente a átomos de enxofre. Por redução monoelectrónica obtém-se um espectro de Mössbauer contendo dois dobletos de quadrupolo distintos: dobleto I, com valores de desvio isomérico e de desdobramento de quadrupolo ($\delta = 0,32$ e $\Delta E_Q = 0,65$ mm/s) médios dos valores de ferro na rubredoxina nos estados oxidado e reduzido, indicando uma valência intermédia de $2,5^+$ para os iões ferro deste dobleto; o dobleto II tem parâmetros característicos de Fe^{3+} de spin elevado ($\delta = 0,3$ e $\Delta E_Q = 0,47$

mm/s). A razão de intensidades destes doubletos é de 2:1, mostrando que o doubleto I corresponde a dois íons ferro, indistinguíveis por espectroscopia de Mössbauer, e o doubleto II a um íon Fe^{3+} , ou seja, no estado reduzido o electrão é partilhado essencialmente por dois átomos de ferro.



[2Fe-2S] - A-oxidado
B-reduzido
T=195 K
(Fd *Scenedesmus*)

[3Fe-xS] A-Oxidado, 77 K
B-Reduzido, 4,2 K
(Fd II de *D.gigas*)



[4Fe-4S] - Fd *B.stearothermophilus*
A- oxidada, 77 K
B- reduzida, 77 K

Figura III.6: Espectros de Mössbauer de centros Fe/S (3,27)

TABELA III.3: Parâmetros de Mössbauer de centros Fe/S

Centro	Estado de oxidação	Desvio isomérico δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Valência média dos átomos de Fe
[Rb]	Oxidado	0,25-0,32	0,5-0,78	3 ⁺
	Reduzido	0,65-0,70	3,25	2 ⁺
[2Fe-2S]	Oxidado	0,22-0,29	0,60-0,66	3 ⁺
	Reduzido	0,22-0,29	0,60-0,80	3 ⁺
		0,55-0,59	2,7-3,0	2 ⁺
[3Fe-xS]	Oxidado	0,27	0,54-0,71	3 ⁺
	Reduzido I	0,46	1,34-1,47	2 x 2,5 ⁺
	II	0,30	0,40-0,48	3 ⁺
[4Fe-4S]	[4Fe-4S] ³⁺	0,31	0,77	2,75 ⁺
	[4Fe-4S] ²⁺	0,41-0,43	0,75	2,5 ⁺
	[4Fe-4S] ¹⁺	0,50-0,60	1,07	2,25 ⁺

Adaptada ref. (3,15,29)

- Centros [4Fe-4s] : no estado de oxidação 2⁺ o espectro de Mössbauer é diamagnético (S=0), consistindo em doubletos de quadrupolo alargados, devido aos átomos de ferro do agregado não serem perfeitamente equivalentes. Os valores de desvio isomérico e de desdobramento de quadrupolo indicam uma valência média para os átomos de ferro de 2,5⁺. Por redução monoelectrônica, o espectro a alta temperatura consiste também em doubletos de quadrupolo com parâmetros característicos de uma valência intermédia de 2,25⁺; para a ferredoxina de *B.stearothermophilus* os parâmetros indicam a presença de dois iões ferro com um estado de oxidação formal médio de 2,5⁺ e dois iões com o estado de oxidação 2⁺. O

estado de oxidação 3^+ destes agregados apresenta a alta temperatura doubletos de quadrupolo com parâmetros indicando uma valência média dos átomos de ferro de $2,75^+$.

III.6-Interconversão entre centros [3Fe-xS] e [4Fe-4S]

Estudos com as ferredoxinas de *D.gigas* e com a aconitase de coração de boi revelaram que a mesma cadeia polipeptídica pode acomodar centros [3Fe-xS] e [4Fe-4S], o que sugere a possibilidade de interconversão entre estes centros. Este processo foi estudado em detalhe (30,31,32), em condições fisiológicas ou por meios químicos, resumindo-se aqui as principais conclusões, usando-se as ferredoxinas de *D.gigas* como protótipo. A ferredoxina II deste organismo contém apenas centros [3Fe-xS], enquanto a ferredoxina I contém essencialmente centros [4Fe-4S] $^{2+}/1^+$.

III.6.1-Conversão por meios químicos

- Por incubação da Fd II reduzida com ditionito, na presença de Fe^{2+} , S^{2-} e ditiotreitól, em condições anaeróbicas, dá-se uma conversão parcial (36-70%) dos centros [3Fe-xS] em centros [4Fe-4S] $^{1+}$, surgindo o espectro de RPE típico destes centros. Por oxidação da amostra, verifica-se uma diminuição da intensidade do sinal de RPE dos centros [3Fe-xS], correspondente àquela interconversão, ou seja, não ocorre uma reformação dos centros [3Fe-xS]. Resultados idênticos foram obtidos para a aconitase (32).

- Por oxidação da ferredoxina I com ferricianeto de potássio dá-se a conversão total dos centros [4Fe-4S] em centros [3Fe-xS]. Este dado é particularmente importante, pois permite

explicar a presença, em numerosas ferredoxinas ou outras proteínas contendo centros $[4\text{Fe-4S}]$, no estado nativo, de um sinal de RPE a $g=2,02$, que pode resultar desta conversão por oxidação dos centros $[4\text{Fe-4S}]$. Esta conversão pode também ocorrer em meio redutor, a elevada força iônica.

- Incubando a enzima aconitase de coração de boi em meio básico ($\text{pH} > 9,5$) ou na presença de ureia (4-8 M), verifica-se a conversão do centro $[3\text{Fe-4S}]$ numa forma linear (Figura III.7) (33). Esta nova conformação dos centros $[3\text{Fe-4S}]$ apresenta um sinal de RPE a $g=4,3$, característico de um spin electrónico $S=5/2$. As propriedades espectroscópicas deste centro linear são idênticas às de um agregado sintético $[\text{Fe}_3\text{S}_4(\text{S-Et})_4]^{3-}$, com uma estrutura linear, sintetizado por Holm et al (34) e que constitui o único agregado Fe/S contendo três átomos de ferro até agora sintetizado com sucesso. Os autores verificaram ainda, por espectroscopia de RPE, que por incubação da aconitase contendo o centro linear, na presença de ferro e em meio redutor, formam-se agregados $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ e $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$.

III.6.2-Conversão em condições fisiológicas

As ferredoxinas de *D.gigas* foram testadas em duas reacções metabólicas das bactérias redutoras de sulfato (35): a reacção fosforoclástica e a redução de sulfito. A Fd II ($E'_0 = -130 \text{ mV}$) é mais eficiente que a Fd I ($E'_0 = -440 \text{ mV}$) na redução de sulfito, enquanto a Fd I é activa na primeira daquelas reacções. A ferredoxina II só participa nesta reacção após uma longa fase de espera. Esta activação foi seguida por espectroscopia de RPE, verificando-se o aparecimento de um sinal de RPE a $g=1,94$ o que

traduz que naquelas condições fisiológicas ocorre a conversão quase total de centros $[3\text{Fe-xS}]$ em centros $[4\text{Fe-4S}]$.

Por incubação da ferredoxina II de *D.gigas* sob hidrogênio e na presença da hidrogenase do mesmo organismo verificou-se também através da espectroscopia de RPE a interconversão (10-40%) dos centros $[3\text{Fe-xS}]$ em centros $[4\text{Fe-4S}]$ (36). Os vários tipos de interconversão esquematizam-se na figura III.7.

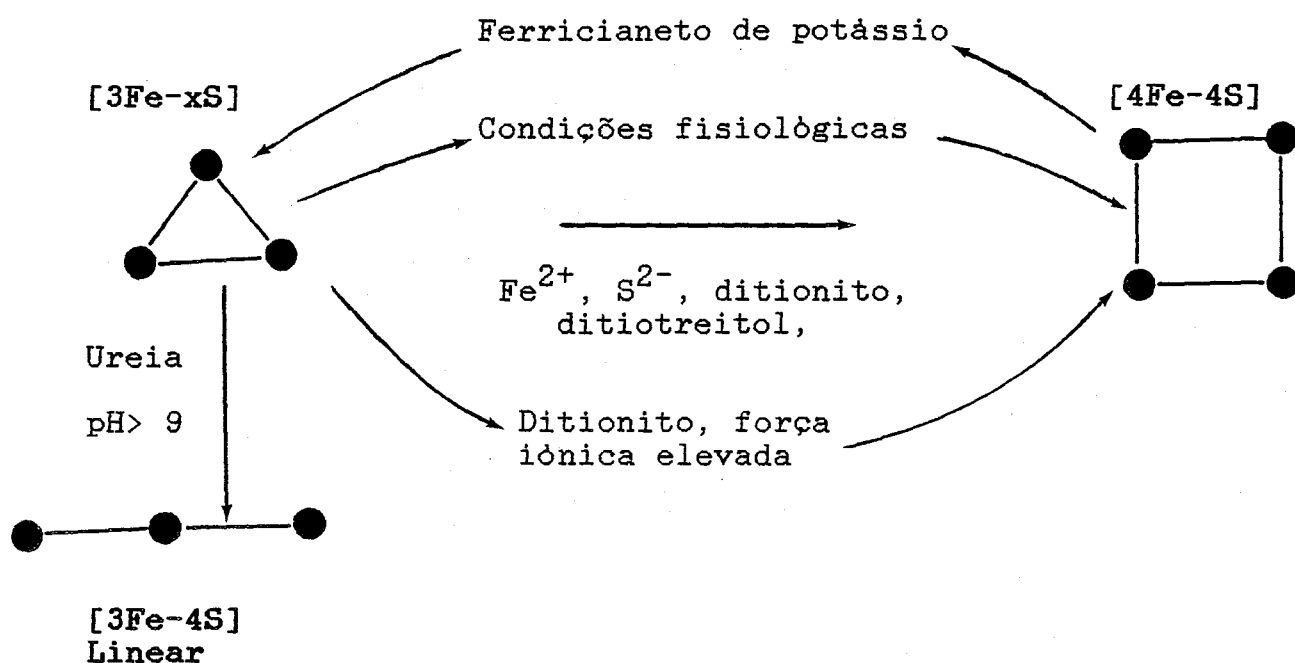


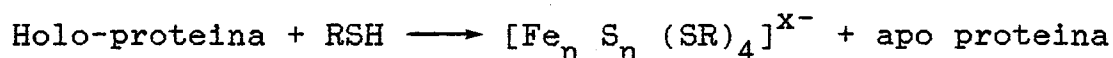
Figura III.7: Interconversão de centros $[3\text{Fe-xS}]$ e $[4\text{Fe-4S}]$
Adaptada Ref. (38)

Estas observações podem ser de particular importância não só para o metabolismo destes organismos, mas também para a síntese de agregados Fe/S marcados isotopicamente com ^{57}Fe ou mesmo, como foi recentemente demonstrado, para a síntese de agregados metálicos mistos nos quais um ou mais dos átomos de ferro são substituídos por outro ião metálico (37). Por outro lado, a ocorrência de interconversão de centros $[3\text{Fe-xS}]$ em centros $[4\text{Fe-4S}]$

4S] leva à necessidade de interpretar os resultados de reacções de extrusão dos centros activos de proteínas contendo agregados Fe/S com particular cuidado, pois a observação de apenas centros [4Fe-4S] extruídos pode resultar daquela interconversão.

III.7-Extrusão de centros ferro-enxofre (39)

Tem sido utilizada como método de identificação de centros ferro-enxofre em proteínas a reacção de extrusão destes agregados através da adição de solventes desnaturantes e de tióis (RSH) (39):



Os produtos da reacção são identificados e quantificados por métodos espectroscópicos de visível/ultravioleta, RMN ou RPE. A sequência de passos do processo de extrusão representa-se esquematicamente na figura III.8. Os solventes usados vulgarmente para a desnaturação são misturas de dimetilsulfóxido (DMSO) ou hexametilfosforamida (HMF) a 80% em água. O agente de extrusão é seleccionado de modo a optimizar a remoção do núcleo Fe_nS_n e a conferir aos agregados extruídos estabilidade e diferenças espectroscópicas que permitam a sua identificação e quantificação. Os ariltióis monofuncionais como o benzenotiol e o o-xililditíol têm-se revelado os mais eficientes. No entanto, e como foi referido na alínea anterior, é necessário impedir a interconversão entre os centros Fe/S. Esta conversão tem-se verificado principalmente em proteínas contendo centros [3Fe-xS]: quando a adição do solvente é efectuada antes da adição do tiol observa-se nos produtos extruídos apenas centros [2Fe-2S] e [4Fe-4S]. Pelo con-

trário, se a adição de reagentes é efectuada por ordem inversa, obtém-se um produto com um espectro de ultravioleta/visível característico, que se pode considerar típico dos centros $[3\text{Fe-xS}]$ (40). Foi também observado que tióis geometricamente mais constrangidos, como o o-xililditiol e o ácido -tiometaloluico, favorecem a conversão a dímero, pelo que o benzenotiol será o tiol mais apropriado para este tipo de reacção.

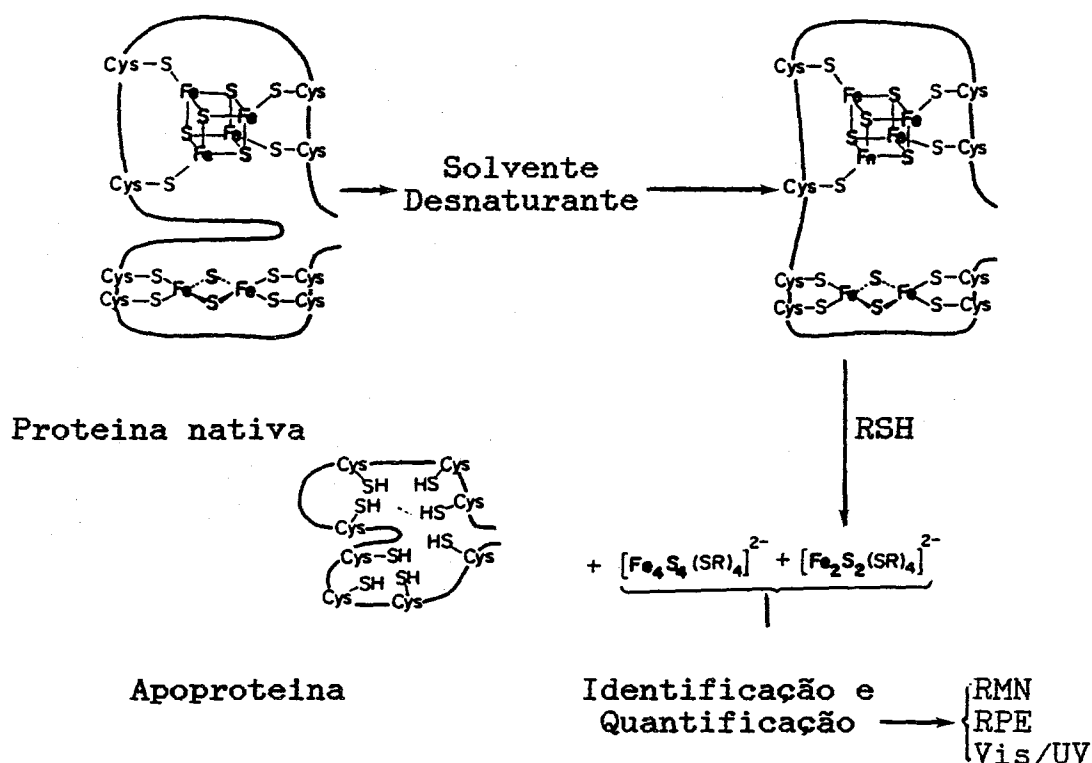


Figura III.8: Representação esquemática das reacções de extrusão (39)

Baseado neste princípio de reacções de extrusão tem sido utilizado ainda outro método para a identificação de agregados Fe/S: a transferência de centro interproteínas, que envolve um primeiro passo de extrusão seguido de uma captura selectiva por uma apoproteína natural. A proteína final é então analisada por métodos espectroscópicos, identificando-se o centro transferido.

Contudo, tal como para a reacção de extrusão simples, é necessário atender à possibilidade de interconversão entre os centros neste processo, para além de ser fundamental uma escolha criteriosa da proteína receptora visto que, como já foi referido, diversas proteínas têm a capacidade de acomodar diferentes tipos de centros Fe/S.

III.8-Identificação de centros Fe/S (41)

A compilação das características espectroscópicas típicas das estruturas básicas dos agregados Fe/S permite uma identificação preliminar do tipo de centro em proteínas contendo estes centros. Os dados adquiridos para as proteínas simples são particularmente úteis no estudo de enzimas complexas, com mais de um tipo de agregado. Na Tabela III.4 mostram-se as técnicas espectroscópicas mais utilizadas que permitem uma identificação inequívoca do agregado. Uma primeira indicação da presença destes centros pode ser obtida a partir da espectroscopia de visível e ultravioleta: o aparecimento de uma banda mal definida com máximo a cerca de 400 nm é típico de proteínas com agregados Fe/S.

- Centros [2Fe-2S] : O espectro de visível e ultravioleta é característico deste tipo de centro. As espectroscopias de dicroísmo circular (DC) e dicroísmo circular magnético (DCM) permitem uma identificação destes centros. O sinal de RPE na forma reduzida varia de axial a rômico, com $g_m = 1.94$ e, em geral, é observável a temperaturas até cerca de 77 K. No estado oxidado, estes centros são silenciosos em RPE.

TABELA III.4: Identificação de centros Fe/S

Centro	Técnica espectroscópica
[2Fe-2S]	Ultravioleta/Visível
	RPE estado reduzido
	DC e DCM

[3Fe-xS]	DCM
	RPE estado nativo
	<u>Mössbauer</u>

[4Fe-4S]	RPE estado oxidado (HIPIP) ou reduzido
	Mössbauer

Adaptada Ref. (41)

- Centros [3Fe-xS] : O espectro de visível e ultravioleta é apenas ligeiramente diferente dos espectros de centros [4Fe-4S]. O espectro de dicroísmo circular magnético é característico, em particular devido ao magnetismo do estado oxidado ($S=1/2$) e ao estado de spin $S=2$ no estado reduzido que pode ser deduzido a partir de curvas de magnetização (42). O espectro de RPE no estado oxidado é praticamente isotrópico, centrado a $g=2,01$, o que pode dar uma identificação preliminar da presença deste tipo de agregado. Contudo, os centros $[4Fe-4S]^{3+/2+}$ no estado oxidado dão também origem a sinais a $g \sim 2$, pelo que a espectroscopia de RPE não permite distinguir entre estes dois tipos de centro. A observação recente de sinais a $g=12$ atribuídos a centros [3Fe-xS]

reduzidos poderá vir a constituir um meio de identificação de agregados $[3\text{Fe-xS}]$ (21). A espectroscopia de Mössbauer tem-se revelado como a técnica mais poderosa para a identificação destes centros, particularmente devido às características espectrais do estado reduzido.

- $[4\text{Fe-4S}]$: O espectro de visível e ultravioleta é também pouco característico. A espectroscopia de RPE tem constituído a técnica básica para a identificação destes centros, a partir da observação dos espectros de RPE no estado reduzido $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$, com $g_m \sim 1,94$. Contudo, como referido anteriormente, a observação recente de estados de spin destes agregados com $S > 1/2$ pode dificultar ou mesmo impedir a detecção de sinais de RPE destes centros. A distinção por espectroscopia de RPE entre centros $[2\text{Fe-2S}]$ e $[4\text{Fe-4S}]$ no estado reduzido tem-se baseado essencialmente nas suas propriedades de relaxação. Os centros do tipo HIPIP podem ser identificados a partir da detecção de sinais de RPE no estado oxidado, embora seja necessária uma comprovação inequívoca pela espectroscopia de Mössbauer, que constitui a principal técnica para a identificação de centros Fe/S.

Outras características físico-químicas têm sido utilizadas para a identificação de centros Fe/S, nomeadamente as reacções de extrusão, referidas na alínea anterior e, nomeadamente na distinção entre centros $[3\text{Fe-xS}]$ e $[4\text{Fe-4S}]^{3+/2+}$, a determinação de potenciais redox: os centros $[3\text{Fe-xS}]$ para os quais até agora têm sido efectuadas estas medidas apresentam potenciais de redução negativos, enquanto os centros do tipo HIPIP apresentam potenciais positivos.

A identificação inequívoca do tipo de centro tem sido

geralmente conseguida pela combinação de varias técnicas espectroscópicas, com particular relevo para as espectroscopias de Mössbauer e RPE. E também fundamental a correlação das intensidades dos espectros obtidos com os resultados de análise química.

III.9-Referências

- 1) M.Adams, L.Mortenson and J.Chen, (1981), Biochim.Biophys.Acta, 594, 105-176
- 2) J.Legall, J.J.G.Moura, H.D.Peck, Jr., and A.V.Xavier, (1982), in "Iron sulfur Proteins", Ed. T.G.Spiro, Academic Press, N.Y., pp 260-370
- 3) A.V.Xavier, J.J.G.Moura and I.Moura, (1981), Structure and Bonding, 43, 187-213
- 4) H.Beinert and A.J.Thomson, (1983), Arch.Biochem.Biophys., 222, 333-361
- 5) C.D.Stout, (1982), in "Iron Sulfur-Proteins", Ed. T.G.Spiro, Academic Press, N.Y., pp 97-146
- 6) M.R.Antônio, B.A.Averill, I.Moura, J.J.G.Moura, W.H.Orme-Johnson, B.K.Teo and A.V.Xavier, (1982), J.Biol.Chem., 257, 6646-6649
- 7) W.V.Sweeney and J.C.Rabinowitz, (1980), Ann.Rev.Biochem., 49, 139-161
- 8) W.H.Orme-Johnson and N.R.Orme-Johnson, (1982), in "Iron-Sulfur Proteins", Ed. T.G.Spiro, Academic Press, N.Y., pp 67-96
- 9) J.J.G.Moura, (1979), Tese de Doutorado, Univ.Nova de Lisboa
- 10) I.Moura and J.J.G.Moura, (1982), in "The Biological Chemistry of Iron", Ed. H.B.Dunford, , pp 179-192

- 11) C.Carter, Jr., (1977), in "Iron-Sulfur Proteins", Ed. W.Lovenberg, Academic Press, N.Y., pp 158-205
- 12) M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, D.V.DerVartanian, J.LeGall, H.D.Peck, Jr., B.H.Huynh and J.J.G.Moura, (1983), Eur.J.Biochem., 130, 481-484
- 13) M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, B.H.Huynh, D.V.DerVartanian, H.D.Peck,Jr., J.LeGall and J.J.G.Moura, (1985), J.Biol.Chem., 260, 8942-8950
- 14) R.Cammack, D.Patil, R.Aguirre and E.C.Hatchikian, (1982), FEBS Lett., 142, 289-292
- 15) J.A.Fee, K.L. Findling, T.Yoshida, R.Hille, G.E.Tarr, D.O.Hearshen, W.R.Dunham, E.P.Day, T.A.Kent and E.Münck, (1984), J.Biol.Chem., 259, 124-133
- 16) M.K.Jonhson, T.G.Spiro and L.E.Mortenson, (1982), J.Biol. Chem., 257, 2447-2452
- 17) T.V.Morgan, P.J.Stephens, F.Devlin, C.D.Stout, K.A.Melis and B.K.Burgess, (1984), Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 81,
- 18) H.J.Krüger, B.H.Huynh, P.O.Ljungdahl, A.V.Xavier, D.V.DerVartanian, I.Moura, H.D.Peck,Jr., M.Teixeira, J.J.G.Moura and J.LeGall, (1982), J.Biol.Chem., 257, 14620-14622
- 19) M.H.Czechowski, S.H.He, M.Nacro, D.V.DerVartanian, H.D.Peck, Jr. and J.LeGall, (1985), Biochem.Biophys.Res.Comm., 108, 1388-1393
- 20) M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, J.J.G.Moura, G.Fauque, B.Pickrill and J.LeGall, (1985), Rev.Port.Quim., 27, 194-195
- 21) W.R.Hagen, W.R.Dunham, M.K.Johnson and J.A.Fee, (1985), Biochim.Biophys.Acta, 828, 369-374
- 22) J.LeGall, P.O.Ljungdahl, I.Moura, H.D.Peck, Jr., A.V.Xavier,

- J.J.G.Moura, M.Teixeira, B.H.Huynh and D.V.DerVartanian, (1982), Biochem.Biophys.Res.Comm., 106, 610-616
- 23) R.Mathews, S.Charlton, R.H.Sands and G.Palmer, (1975), J.Biol.Chem., 249, 4326-4328
- 24) P.A.Lindahl, W.H.Orme-Johnson, P.E.Day, T.A.Kent and E.Münck, (1985), Rev.Port.Quim., 27, 191-193
- 25) J.M.Moulis, P.Auric, J.Gaillard and J.Meyer, (1984), J.Biol.Chem., 259, 11398-11462
- 26) G.Fauque, M.Teixeira, I.Moura, P.A.Lespinat, A.V.Xavier, D.V.DerVartanian, H.D.Peck,Jr., J.LeGall and J.J.G.Moura, (1984), Eur.J.Biochem., 142, 21-28
- 27) R.Cammack; D.P.E.Dickson and C.E.Johnson, (1977), in "Iron-Sulfur Proteins", Ed. W.Lovenberg, Academic Press, N.Y., pp 283-330
- 28) E.Münck, (1982), in "Iron-Sulfur Proteins", ed T.G.Spiro, Academic Press, N.Y., pp 147-176
- 29) R.Cammack, (1979), in "MettaloProteins: Structure, Function and Clinical Aspects", ed. U.Weser, pp 162-184
- 30) T.A.Kent, I.Moura, J.J.G.Moura, J.D.Lipscomb, B.H.Huynh, J.LeGall, A.V.Xavier and E.Münck, (1982), FEBS Lett., 138, 55-58
- 31) J.J.G.Moura, I.Moura, T.A.Kent, J.D.Lipscomb, B.H.Huynh, J.LeGall, A.V.Xavier and E.Münck, (1982), J.Biol.Chem., 257, 6259-6267
- 32) T.A.Kent, J.L.Dreyer, M.C.Kennedy, B.H.Huynh, M.Emptage, H.Beinert and E.Münck, (1982), Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 79, 1096-1100
- 33) M.C.Kennedy, T.A.Kent, M.Emptage, H.Merkle, H.Beinert and E.Münck, (1984), J.Biol.Chem., 259, 14463-14471

- 34) K.S.Hagen, A.D.Watson and R.H.Holm, (1983), J.Am.Chem.Soc., 105, 3905-3913
- 35) J.J.G.Moura, A.V.Xavier, E.C.Hatchikian and J.LeGall, (1978), FEBS Lett., 89, 177-179
- 36) M.Teixeira, I.Moura and J.J.G.Moura, (1985), Resultados não publicados
- 37) I.Moura, J.J.G.Moura, E.Münck, V.Papaefthymiou and J.LeGall, (1986), J.Am.Chem.Soc., 108, 349-351
- 38) E.Münck and T.A.Kent, (1985), International Mössbauer Meeting, Belgium,
- 39) J.M.Berg and R.H.Holm, (1982), in "Iron-Sulfur Proteins", Ed. T.G.Spiro, Academic Press, N.Y., pp 1-66
- 40) J.J.G.Moura, J.LeGall and A.V.Xavier, (1984), Eur.J.Biochem., 141, 319-322
- 41) I.Moura and J.J.G.Moura, (1983), Resultados não publicados
- 42) M.K.Johnson, A.E.Robinson and A.J.Thomson, (1982), in "Iron-Sulfur Proteins", Ed. T.G.Spiro, Academic Press, N.Y., pp 407-424

CAPITULO IV:
ACTIVACAO DE HIDROGENIO
PELA HIDROGENASE

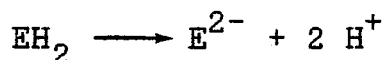
A hidrogenase é uma enzima que apresenta características bastante diversificadas, conforme o organismo de que é isolada. Contudo, os resultados obtidos para as hidrogenases do tipo [NiFe], nomeadamente as isoladas de bactérias redutoras de sulfato, mas também as de outros tipos de organismos (por exemplo metanogénicos, fotossintéticos e facultativos), revelam uma certa uniformidade de características, em particular no que se refere aos estados reduzidos, que traduzem provavelmente os estados em que a enzima funciona *in vivo*. O esquema geral que tem sido proposto para o ciclo catalítico (1), sem atender à função de cada centro enzimático, pode resumir-se nos seguintes passos:

OXIDACAO DE H₂

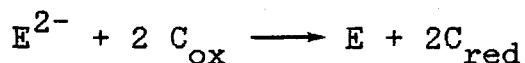
1-Complexação de H₂



2-Dissociação dos protões



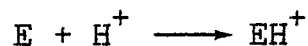
3-Transferência electrónica de E para um transportador endógeno ou exógeno



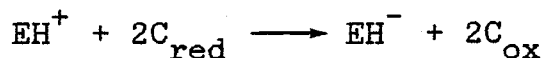
(E-enzima; C-transportador de carga exógeno ou endógeno)

PRODUCAO DE H₂

1-Protonação de E



2-Transferência electrónica para E



3-Protonação, seguida de evolução de H₂

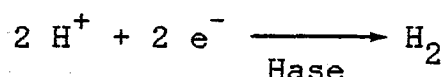


Para uma compreensão do mecanismo em termos moleculares é necessário identificar os diversos intermediários do processo, o que constituiu um dos objectivos principais deste trabalho. Os dados obtidos, apresentados nos capitulos seguintes, foram comparados com dados relevantes de outros autores de modo a correlacionar os estudos espectroscópicos (RPE, Mössbauer) e as determi-

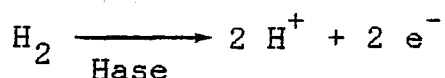
nações de potenciais redox com os estudos de actividade catalítica, delineando-se um esquema catalítico que evidencia a função dos diversos centros metálicos da enzima e as transformações por eles sofridas durante o ciclo catalítico de produção ou consumo de hidrogénio. Assim, serão agora apresentados os dados considerados mais relevantes para a interpretação dos resultados obtidos na caracterização físico-química das hidrogenases e que permitirão enquadrar as diversas experiências efectuadas no referido objectivo.

A actividade da enzima hidrogenase pode ser determinada por diversos processos (ver Apêndice):

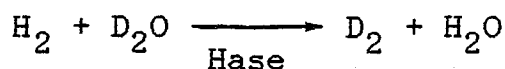
-Produção de H_2 , na presença de um doador de electrões



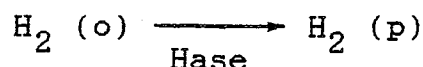
-Consumo de H_2 , na presença de um aceitante de electrões



-Permuta D_2/H^+ ou H_2/D^+ , na ausência de qualquer transportador de electrões (balanço electrónico nulo)



-Permuta de hidrogénio orto/para, também na ausência de qualquer transportador de electrões (balanço electrónico nulo)



Estas reacções têm sido utilizadas para elucidar o mecanismo de funcionamento da enzima, como se verá de seguida.

IV.1-Activação da molécula de H₂

O primeiro passo do ciclo catalítico de consumo de hidrogénio pela hidrogenase é a activação da molécula de hidrogénio. Assim, serão discutidos brevemente os modos de activação de H₂ por iões de metais de transição e, em seguida, apresentar-se-ão os dados de que se dispõe em relação à enzima hidrogenase.

IV.1.1-Activação de hidrogénio por metais de transição

As reacções de hidrogenação de hidrocarbonetos insaturados são frequentemente catalisadas por complexos de iões de metais de transição (1-5). Tem sido proposto que a espécie cataliticamente activa é, em geral, um complexo hidreto, embora raras vezes tenham sido isolados estes intermediários. A evidência experimental que suporta esta hipótese é, pois, indirecta, resultando essencialmente de estudos cinéticos e do mecanismo das reacções envolvidas. Estes dados têm sido também usados para a determinação do modo de activação de hidrogénio nos passos iniciais da reacção. Esta activação pode ocorrer por três processos (3-5):

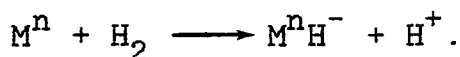
- adição oxidativa;



- cisão homolítica;



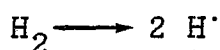
- cisão heterolítica



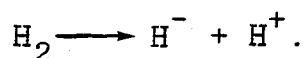
Usando a descrição formal da ligação M-H, que considera o ligando hidreto como uma espécie aniónica (H⁻), tanto a adição oxidativa como a cisão homolítica envolvem uma oxidação do ião

metálico. Apenas na cisão heterolítica se mantém o estado de oxidação do metal.

Considerando os calores de hidratação molares para o protão, o hidreto e o hidrogénio molecular e atómico, os valores do potencial de ionização e da afinidade electrónica do átomo de hidrogénio e a energia de dissociação da ligação H-H, obtêm-se (4) valores de $100 \text{ kcal mol}^{-1}$ para a cisão homolítica



e de 37 kcal mol^{-1} para a cisão heterolítica



Estes resultados parecem apontar para uma preferência, em termos termodinâmicos, pela cisão heterolítica. Contudo, a natureza do centro metálico que interactua com H_2 é determinante para o mecanismo que, de facto, ocorre.

Ambos os tipos de cisão podem ocorrer por formação prévia de uma espécie dihidreto mas, cineticamente, não é possível fazer uma distinção em relação ao passo concertado. A cisão heterolítica por M^{n+1} e a cisão homolítica por M^n dão origem a M^{n+1}H , sendo assim difícil identificar o precursor. Esta distinção só é possível se forem conhecidos os estados de oxidação das espécies activas.

Qualquer dos modos de activação requer a existência de um sítio de coordenação livre no metal ou a sua criação por dissociação de um ligando. Efeitos de solvatação e de força iónica podem também fazer variar a natureza da ruptura da ligação H-H; por exemplo, no caso da cisão heterolítica o solvente pode actuar como um base ligando-se ao protão ou estabilizar o estado de transição que envolve separação de cargas.

IV.1.1.1-Adição oxidativa

Para que ocorra este tipo de adição é necessária a existência de dois sítios de coordenação vagos e , devido à oxidação do metal, deve existir um estado de oxidação estável duas unidades mais elevado.



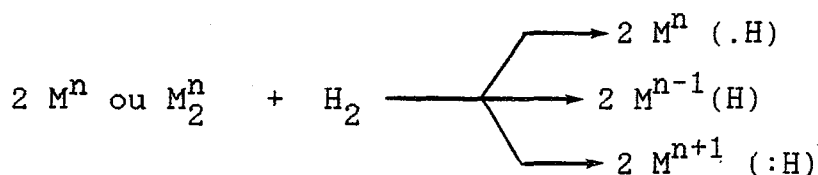
Assim, este processo é mais favorável em estados de oxidação baixos e em centros metálicos com basicidade elevada. Esta característica aumenta, para uma dada configuração d, quando se desce uma triade, e da direita para a esquerda ao longo de uma série de transição. Os ligandos que aumentam a densidade electrónica no metal favorecem este tipo de reacção, que é comum em complexos quadrangulares planos de iões d^8 , resultando na formação de um dihidreto octaédrico, uma geometria favorável para iões d^6 .

A adição oxidativa é pouco frequente em metais do grupo VIII (Ni, Pt e Pd), devido à sua fraca tendência para formar complexos com números de coordenação elevados e à instabilidade dos estados de oxidação superiores a +2. Assim, de entre os iões Ni^{2+} , Pd^{2+} e Pt^{2+} , apenas para este último têm sido encontradas reacções de adição oxidativa de H_2 .

IV.1.1.2-Cisão homolitica

Esta cisão pode ocorrer a partir da reacção da molécula de hidrogénio com complexos diméricos ou com dois complexos

idênticos :



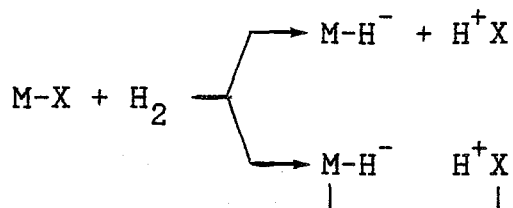
A formulação correcta dos produtos depende da posição do electrão originalmente associado ao átomo de hidrogénio. Alguns hidretos, como $MnHCO_5$, $CoHCO_4$ e $CoHCN_5^{3-}$, actuam como catalisadores de reacções de hidrogenação que envolvem intermediários radicalares, o que significa que nestes casos o ião hidreto é melhor descrito como um átomo de hidrogénio estabilizado ($M-H^\cdot$). Em outros casos, a adição de H_2 tem sido considerada redutiva. Contudo, a característica fundamental para a ocorrência da cisão homolítica parece ser a existência de dois estados de oxidação estáveis separados apenas de uma unidade, o que sugere a manutenção do formalismo do ligando hidreto como H^- .

IV.1.1.3-Cisão heterolítica

Este tipo de cisão leva à formação de um complexo monohidreto e de um protão, pelo que é necessária a sua estabilização por uma base, que pode ser externa:

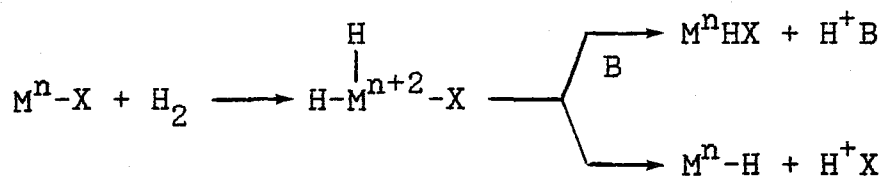


ou interna, isto é, um ligando do metal M:



Ocorre geralmente quando não há estados de oxidação superiores elevados, estáveis.

Uma cisão heterolítica efectiva pode resultar de uma adição oxidativa de H_2 seguida de eliminação redutiva de HX



ou de desprotonação do dihidreto por uma base. Assim, quando se postula este mecanismo, é possível que de facto envolva passos iniciais de adição-eliminação.

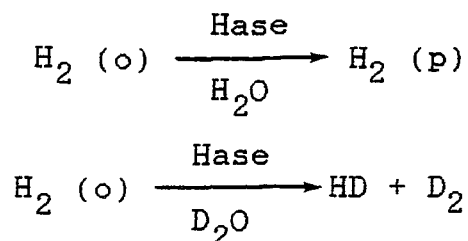
Este tipo de cisão tem sido proposto para um número restrito de sistemas : iões Ru^{3+} , Rh^{3+} , Sr^{3+} , Pd^{2+} , Pt^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Ag^+ e Hg^{2+} (3,4), para além da enzima hidrogenase e do sistema modelo desta enzima, já referido, Pd-Salen (21).

IV.1.2-Activação de hidrogénio pela hidrogenase

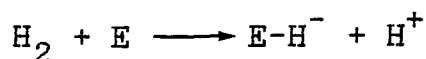
As reacções de permuta isotópica hidrogénio/deutério ou de hidrogénio (orto) / hidrogénio (para) são reacções de balanço electrónico nulo, constituindo um meio de estudar especificamente o centro enzimático responsável pela activação da molécula de hidrogénio. Estas reacções foram utilizadas por diversos autores para a determinação do modo de activação de H_2 pela hidrogenase.

IV.1.2.1-Conversão de hidrogénio orto/para

Krasna e Rittenberg (6), usando células inteiras e extractos brutos de *Proteus vulgaris* verificaram que em solução aquosa a hidrogenase deste organismo catalisa a conversão de hidrogénio orto em hidrogénio para, mas que em solução de D_2O não se dá a conversão, ocorrendo então a permuta H_2/D^+ :



Este resultado foi interpretado como indicativo de uma cisão heterolítica da molécula de hidrogénio



com formação de um complexo enzima-hidreto (E-H^-) e de um protão, possivelmente estabilizado por uma base na proximidade do centro catalítico. A ausência de conversão $\text{H}_2(\text{o})/\text{H}_2(\text{p})$ em D_2O sugere que um dos sítios de ligação dos átomos de hidrogénio permuta muito mais rapidamente com a água que o outro. De facto, se a cisão fosse homolítica, ambos os sítios de ligação seriam idênticos e, assim, deveria ocorrer a conversão orto/para em ambos os solventes.

IV.1.2.2-Permuta de hidrogénio/deutério

A hidrogenase catalisa as reacções de permuta isotópica H_2/D^+ ou D_2/H^+ . Os estudos realizados com diversas hidrogenases (7-15) mostram que o produto da reacção que inicialmente se forma em maior quantidade é a espécie intermédia HD. Este resultado tem sido interpretado como uma evidência para a activação de hidrogénio pelo modo heterolítico, em que, como já referido na alínea anterior, um dos átomos de H (ou D) ligado à enzima permuta mais rapidamente com o solvente que o outro. A espécie de permuta total, D_2 ou H_2 , resultaria de uma segunda reacção de permuta a partir de HD. Contudo, a concentração inicial daqueles produtos não é nula e, conforme o organismo de onde é isolada a

hidrogenase, têm sido obtidos diversos valores para a razão das concentrações iniciais (ou velocidades iniciais de formação) dos produtos de permuta D_2/HD ou H_2/HD (Tabela IV.1).

Tabela IV.1: Razões iniciais dos produtos de permuta isotópica

Organismo	D_2/HD	H_2/HD	Ref.
<i>Proteus vulgaris</i> (a)	0,2	0,2	11
<i>C.pasteurianum</i> (a)	<u>0.45</u>	--	11
<i>Scenedesmus</i> (a)	0,5	--	11
<i>D.vulgaris</i> (Myazaki)	<u>0.17-0.26</u>	<u>0.4</u>	10
<i>D.gigas</i> (b)	--	0,55	13
<i>D.baculatus</i> (b)			13 (c)
membranar	--	1,36	
periplásmica	--	1,51	
citoplásmica	--	1,35	
<i>D.vulgaris</i> (b) (Hildenborough)	--	0,70	13
<i>D.salexigens</i> (b)	--	> 1	(c)
<i>D.desulfuricans</i> (b) (ATCC 27774)	--	< 1	(c)
<i>D.multispirans</i> (b) n.sp.	--	< 1	13
<i>Ms.barkeri</i> (b)	--	0,42	13

(a) Ensaio realizados com células inteiras ou extractos brutos
Os valores sublinhados foram calculados por extrapolação para
concentração de enzima nula

(b) Valores a pH=7,8

(c) Resultados apresentados neste trabalho, em colaboração com
Y.Berlier, P.A.Lespinat, G.Fauque e J.LeGall

A presença de D_2 na fase inicial da reacção tem sido explicada por diversos mecanismos (8,10-12), mas mantendo sempre a hipótese de cisão heterolítica.

i) A espécie HD formada nos passos iniciais reage novamente com a enzima antes de se libertar para a fase gasosa. Este processo intermolecular seria limitado por difusão e a sua velocidade dependeria da concentração da enzima. Yagi *et al* (10), com a hidrogenase de *D.vulgaris* (estirpe Myazaki) e Tamiya *et al* (11) com extractos de *Proteus vulgaris* e *C.pasteurianum*, verificaram que a razão dos produtos primários da reacção (D_2/HD) é função da concentração da enzima, mas atinge um valor limite, por extrapolação para concentração nula, diferente de zero (entre 0,2 e 0,4). Por exemplo, para *Proteus vulgaris*, a razão varia entre 0,17 e 0,6 e, para concentrações elevadas de células, praticamente só se detecta a presença de D_2 na fase gasosa. Assim, estes resultados são compatíveis com esta primeira explicação e estão de acordo com as observações de Halpern *et al* (16) para o sistema catalítico de cloreto de ruténio (ver capítulo II), mas não permitem explicar o valor da razão limite.

ii) Outro processo que tem sido evocado consiste no que se designou por Efeito de Gaiola ("Cage Effect") - a molécula de HD seria retida no interior da própria enzima, sofrendo uma segunda reacção de permuta antes de se libertar para a solução.

iii) A terceira hipótese pressupõe que ambos os sítios proteicos aceitadores do protão e do ião hidreto podem permutar com o solvente, independentemente, levando assim à formação de HD e D_2 . A quantidade de cada produto dependeria das velocidades relativas de permuta. De acordo com este mecanismo, a razão dos produtos deveria variar com o pH da solução, o que de facto se observa a partir dos resultados de Tamiya *et al* (11), Arp *et al* (12) e Lespinat *et al* (13) (Figura IV.1). Este resultado são concordan-

tes com os obtidos para os sistemas modelo de rutênio e paládio (ver capítulo II).

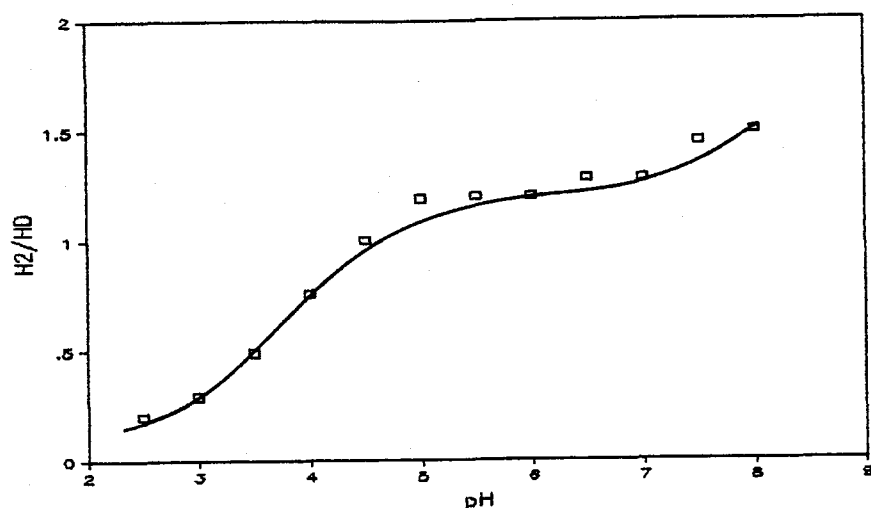


Figura IV.1: Dependência da razão H_2/HD com o pH para a hidrogenase citoplásmica de *D.baculatus*

Os três mecanismos apresentados permitem racionalizar os resultados obtidos e atribuí-los a diferenças nos centros enzimáticos de ligação ao ião hidreto e ao próton (por exemplo, diferentes valores de pK_a). Neste contexto, é de referir que algumas das hidrogenases que apresentam razões superiores a 1 (hidrogenases de *D.baculatus* e *D.salexigens*) contêm selênio na razão de 1:1 com o níquel (este trabalho, Capítulos VI e VII).

Outro dado relevante obtido por experiências de permuta isotópica é a dependência desta actividade com o pH: a actividade apresenta um máximo a valores de pH intermédios (Tabela IV.2, Figura IV.2). Esta dependência tem sido explicada também com base no mecanismo heterolítico, tal como se discutiu para o sistema modelo Pd-salen (capítulo II), sendo contudo de referir que em condições extremas de pH pode ocorrer a desnaturação das enzimas:

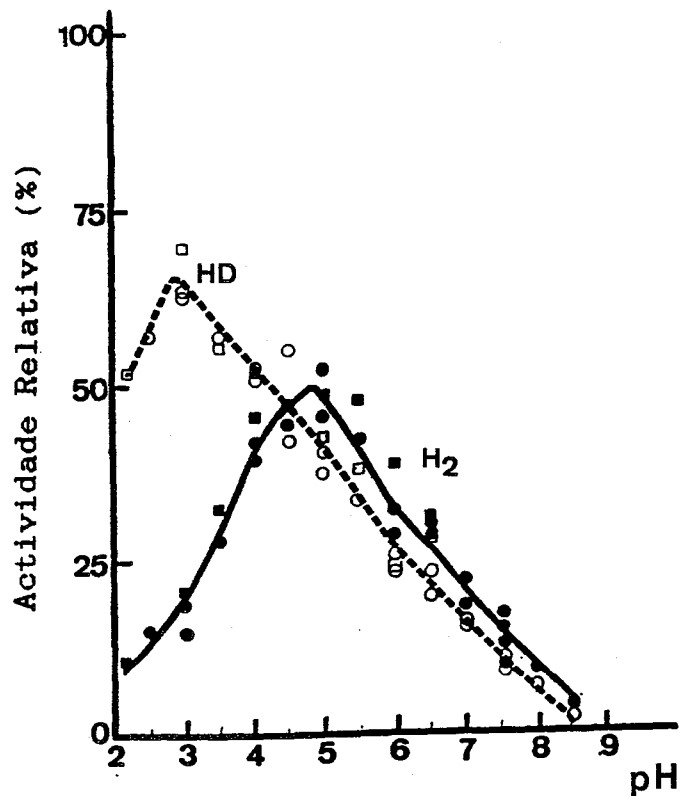


Figura IV.2: Dependência com o pH da atividade de permuta isotópica da hidrogenase citoplasmática de *D.baculatus* (13)

Tabela IV.2: Dependência da atividade de permuta isotópica com o pH

Organismo	pH de actividade máxima	Ref
<u>Células</u>		
<i>Proteus vulgaris</i>	6,5-7	7,11
<u>Extractos celulares</u>		
<i>C.pasteurianum</i>	8,3	11
<i>D.vulgaris</i> (Hildenborough)	5,5	11
<u>Enzimas puras</u>		
<i>D.gigas</i>	8	13
<i>D.baculatus</i>	4	13
<i>D.vulgaris</i> (Hildenborough)	4,5	13
<i>D.multispirans</i> n.sp.	< 7	13
<i>R.capsulata</i>	4	15

- a pH ácido, o passo limitante da reacção seria a cisão da molécula de hidrogénio, pois o sitio de aceitação do protão estará protonado;
- a pH básico o passo limitante consiste na re formação da molécula de hidrogénio, uma vez que o sitio de aceitação do protão estará desprotonado.

Não se dispõe de dados que permitam atribuir a diferença dos valores de pH a que se manifesta a actividade máxima de permuta a características específicas dos centros catalíticos, em particular à presença de selénio, pois apenas para as hidrogenases de *D.baculatus* são conhecidos estes valores.

IV.2-Activação da hidrogenase

Os estudos originais de Krasna, Rittenberg, Fischer e colaboradores (6-8), com células inteiras ou extractos enzimáticos brutos, mostraram que a actividade catalítica da hidrogenase requeria um processo de activação, isto é, a actividade máxima só era atingida ao fim de um certo intervalo de tempo ("lag phase" ou "fase de espera"), variável conforme o organismo e o estado da enzima. Este tempo de espera era maior nos extractos brutos que nas células inteiras. Verificou-se também que a actividade é inibida reversivelmente pelo oxigénio. A fase de espera pode ser reduzida por diversos processos, químicos ou físicos:

- adição de uma armadilha de oxigénio, como o sistema enzimático glucose/glucose oxidase;
- remoção de oxigénio por incubação da amostra em meio estritamente anaeróbico (azoto ou argon);
- adição de um redutor químico, como o ditionito de sódio;

- incubação das amostras sob hidrogénio.

Os dois primeiros processos permitem apenas diminuir o tempo de espera, enquanto os dois últimos possibilitam a sua eliminação total. Estes resultados levaram os autores a sugerir que a activação consiste em dois processos distintos. O primeiro processo seria a remoção de oxigénio da amostra; o facto de este processo poder ser eliminado por desoxigenação através de processos estritamente físicos sugere que um dos factores responsável pela inactivação da hidrogenase pelo oxigénio se deve a reacções de oxigenação e não de oxidação da enzima, devidos eventualmente à formação de complexos enzima/oxigénio. O segundo processo, que é eliminado apenas em meio redutor (hidrogénio ou ditionito), consistiria numa redução de centros enzimáticos.

Recentemente Y.Berlier (9), T.Lissolo (17) e R.Mege (18) e colaboradores realizaram estudos semelhantes com amostras puras da hidrogenase de *Desulfovibrio gigas*, que permitiram não só confirmar os resultados originais obtidos a partir de células e extractos brutos, mas também uma melhor compreensão dos processos envolvidos.

Berlier et al (9) estudaram a actividade da hidrogenase de *D.gigas* na reacção de permuta D_2/H^+ . Verificaram que a enzima isolada requer activação e, analisando a influência de vários agentes externos neste processo, concluíram que ele ocorre em duas fases distintas (Figura IV.3):

- fase de espera, que consiste na eliminação de oxigénio. Esta fase pode ser acelerada na presença de concentrações crescentes de citocromo c_3 tetrahémico de *D.gigas*, de ditionito de sódio ou de armadilhas de oxigénio, (sistema glucose/glucose oxidase) ou

ainda por incubação sob argon;

- fase de redução, que consiste na redução da enzima sob hidrogénio ou por ditionito de sódio. A redução foi detectada por diminuição da absorvância no espectro de visível da hidrogenase sob hidrogénio, a 400 nm. A cinética desta segunda fase é independente da presença ou ausência de citocromo.

A velocidade final da reacção de permuta é independente da concentração de qualquer dos compostos externos (citocromo c_3 , ditionito ou glucose/glucose oxidase). A separação entre as duas fases de activação é tanto mais nitida quanto menos activa for a preparação da enzima e verifica-se também que a segunda fase está sempre presente.

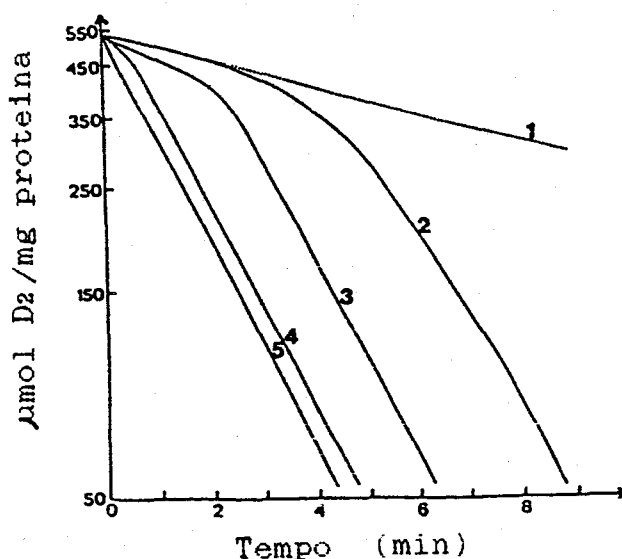


Figura IV.3: Activação da hidrogenase de *D. gigas* na reacção de permuta D_2/H^+ (9)

1-Linha de base

2-Na ausência de c_3 e ditionito

3-Na presença de c_3 (1 nM)

4-Na presença de c_3 (10 nM)

5-Na presença de ditionito de sódio (27 μM)

Lissolo *et al* (12) estudaram a activação da hidrogenase de *D. gigas* para a reacção de consumo de H_2 na presença de benzil

viologénio como aceitante de electrões. Detectaram novamente a presença de uma fase de espera, com as características já atrás enunciadas. A cinética de activação sob hidrogénio pode ser separada em duas partes:

- uma fase mais longa, em que a actividade se mantém essencialmente constante;
- uma fase curta, em que a actividade aumenta exponencialmente.

Este fenómeno foi também observado para a hidrogenase de *D.desulfuricans* (ATCC 27774), mas não para a hidrogenase de *D.vulgaris* (Hildenborough).

Os autores verificaram igualmente que a activação é reversível: a hidrogenase é inactivada na presença de ar, mas mantém a actividade quando mantida em meio anaeróbico. Por isso, concluíram que a activação não pode ser atribuída à formação de um complexo E-H₂, que seria destruído na presença de azoto, pelo que deve resultar de uma reacção redox, tal como foi observado por espectroscopia de visível por Berlier et al (9) . Por este facto, estudaram a influência do potencial redox na activação, realizando experiências de activação sob diferentes pressões parciais de hidrogénio (1 a 5×10^{-5} atm) correspondendo a uma variação de potencial redox entre -450 e -320 mV, a pH=7,5 (Figura IV.4).

O valor máximo de actividade obtido após activação é função do potencial redox, o que indica claramente que a actividade é regulada por um processo redox. Ajustando uma curva de Nernst para um processo monoelectrónico obtém-se para aquele processo um potencial de -340 mV, a pH=7,5, dependente do pH, decrescendo cerca de 60 mV por unidade de pH. Este potencial tem um valor muito próximo do detectado para a formação de espécies

paramagnéticas de níquel observadas por espectroscopia de RPE em diversas hidrogenases [NiFe], sugerindo que estas espécies podem representar intermediários do ciclo catalítico destas enzimas (ver Capítulos V-VII). Resultados semelhantes foram obtidos por Fernandez et al (18) para a actividade de produção de hidrogénio pela hidrogenase de *D.gigas*.

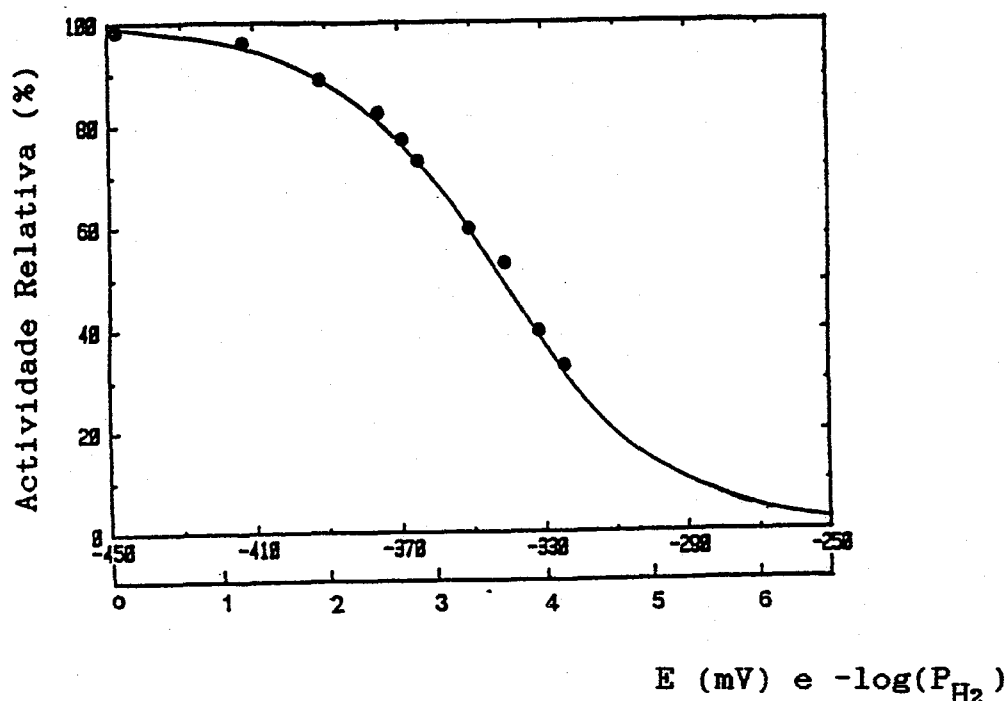


Figura IV.4: Dependência da activação da hidrogenase de *D.gigas* sob H₂ com o potencial redox, pH=8 (17)

R.Mege e C.Bourdillon (19) desenvolveram um método electroquímico para a medição da actividade da hidrogenase. Utilizando a hidrogenase de *D.gigas*, este método permitiu estudar a influência do potencial redox na actividade de consumo de H₂, após uma activação primária sob hidrogénio semelhante á descrita anteriormente. Os autores verificaram que a actividade da enzima é controlada anaerobicamente pelo potencial redox, num processo monoelectrónico com um potencial formal de -210 mV dependente do pH (decrece cerca de 60 mV por unidade de pH) (Figura IV.5).

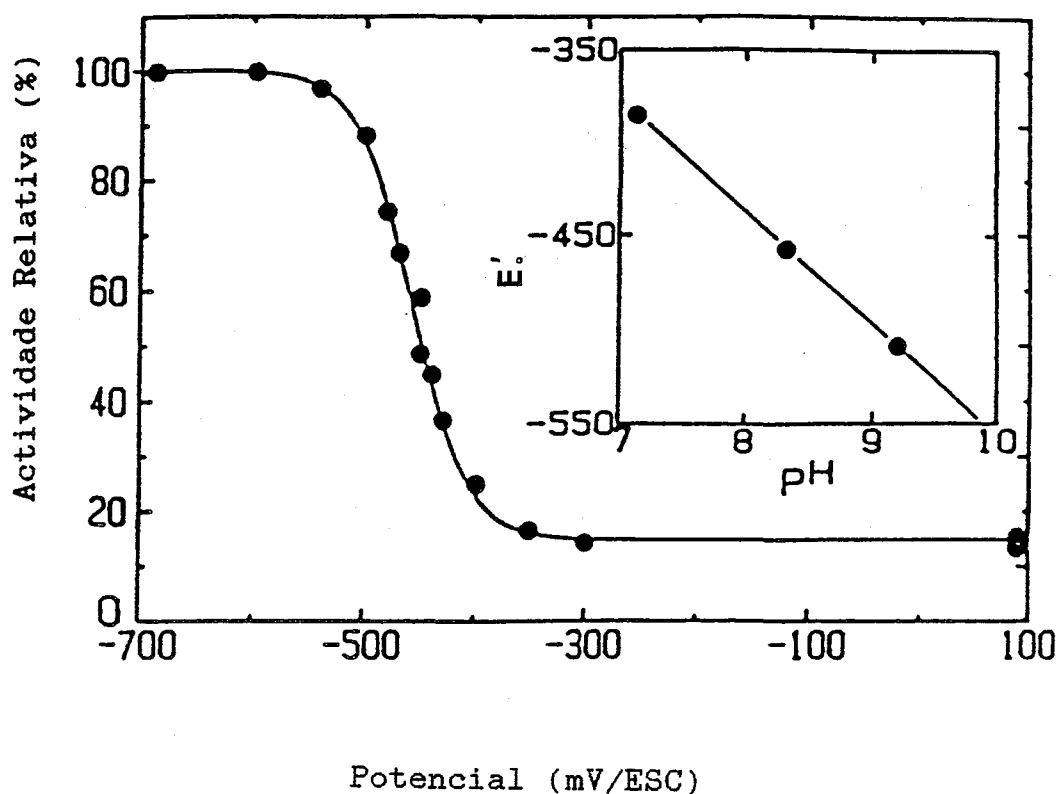


Figura IV.5: Actividade da hidrogenase de *D.gigas* em função do potencial redox (19)

Este potencial redox tem um valor semelhante ao detectado por titulação redox seguida por espectroscopia de RPE para as hidrogenases de *D.gigas* (Capítulo V) e *Ch.vinosum* (20), associado ao desaparecimento do sinal de RPE de níquel presente no estado nativo destas enzimas (Capítulo V).

IV.3-Conclusão

Os estudos de actividade catalítica apresentados neste capítulo referem-se a um número limitado e heterogêneo de organismos. Contudo, e como será discutido detalhadamente no capítulo X, parece haver uma certa uniformidade de características físico-químicas nas hidrogenases do tipo [NiFe] isoladas de organismos redutores de sulfato. Este facto permite extrapolar os dados obtidos para a hidrogenase de *D.gigas*, a enzima para a qual têm sido realizados maior número de estudos e que poderá ser conside-

rada como o protótipo deste grupo de enzimas, para as hidrogenases [NiFe]. Assim, poderão resumir-se os dados apresentados no seguinte número de pontos:

- as hidrogenases, em geral, não são activas no estado em que são isoladas; é necessario a ocorrência de um processo de activação bifásico, consistindo numa primeira fase de desoxigenação da enzima e numa segunda fase de redução de centros enzimáticos;
- a activação da enzima está associada a processos redox mono-electrónicos, com $E'_O = -220$ mV e -350 mV (pH=8,5), ambos dependentes do pH;
- a activação da molécula de H_2 ocorre segundo um processo heterolítico.

IV.4-Referências

- 1) M.Adams, L.Mortenson and J.Chen, (1981), Biochim.Biophys.Acta, 594, 105-176
- 2) B.R.James,(1982) in Comprehensive Organometallic Chemistry, Vol. VIII, Cap.51, ed. G.Wilkinson, Pergamon Press, USA
- 3) P.Brothers, (1981), Prog. Inorg. Chem., 28, 1-61,
- 4) B.R.James, (1972), "Homogeneous Hydrogenation", John Wiley, N.Y.
- 5) J.Collman and J.Hegedus, (1981), "Principles and Applications of Organo Transition Metal Chemistry ", Univ.Science Books, USA
- 6) A.I.Krasna and D.Rittenberg, (1954), J.Am.Chem.Soc., 76, 3015-3020
- 7) H.F.Fischer, A.I.Krasna and D.Rittenberg, (1954), J.Biol. Chem., 209, 569-578
- 8) H.Hoberman and D.Rittenberg, (1943), J.Biol.Chem.,147, 211-227

- 9) Y.M.Berlier, G.Fauque, P.A.Lespinat and J.LeGall, (1982), FEBS Lett., 140, 185-188
- 10) T.Yagi, M.Tsuda and H.Inokuchi, (1973), J.Biochem., 73, 1069-1081
- 11) N.Tamiya and S.Miller, (1963), J.Biol.Chem., 238, 2194-2198
- 12) R.J.Arp and R.H.Burris, (1982), Biochem. Biophys.Acta, 700, 7-15
- 13) P.A.Lespinat, Y.Berlier, G.Fauque, M.Czechowski, B.Dimon and J.LeGall, (1986), Biochimie, 68, 55-61
- 14) M.Teixeira, I.Moura, G.Fauque, M.Czechowski, Y.Berlier, P.A.Lespinat, J.LeGall, A.V.Xavier and J.J.G.Moura, (1986), Biochimie, 68, 75-84
- 15) R.Colbeau and P.M.Vignais, (1981), Biochem.Biophys.Acta, 662, 271-284
- 16) J.Halpern and B.James, (1960), Can.J.Chem., 44, 671-675
- 17) T.Lissolo, S.Pulvin and D.Thomas, (1984), J.Biol.Chem., 259, 11725-11729
- 18) R.M. Mege and D.Bourdillon, (1985), J.Biol.Chem.,
- 19) V.M.Fernandez, R.Aguirre and E.C.Hatchikian, (1984), Biochim.Biophys.Acta, 790, 1-7
- 20) S.P.J.Albracht, J.W.van de Zwann and R.D.Fontjin, (1984), Biochim.Biophys.Acta, 766, 245-258
- 21) H.Olivé and S.Olivé, (1975), J.Mol.Cat., 1, 121-125

CAPITULO V:
HIDROGENASE DE
DESULFOVIBRIO GIGAS

A hidrogenase de *Desulfovibrio gigas* (NCIB 9332), uma bactéria redutora de sulfato, foi caracterizada pela primeira vez por Hatchikian *et al* (1). Bell e colaboradores (2) mostraram que esta hidrogenase se encontra no espaço periplásmico da célula, e propuseram que esta localização representa uma adaptação específica de organismos anaeróbicos para o crescimento simbiótico com outros organismos deste tipo, nomeadamente metanogénicos, dotando-os assim de uma maior versatilidade na adaptação ao meio ambiente. Esta localização da hidrogenase é também pertinente para a bioenergética de bactérias do género *Desulfovibrio* (Capítulo I).

Baseados nos resultados de análise química e em experiências de extrusão dos centros enzimáticos, Hatchikian *et al* (1) propuseram que a hidrogenase de *D.gigas* contém três centros [4Fe-4S]. Como se verá neste Capítulo, este resultado revelou-se parcialmente incorrecto: a hidrogenase de *D.gigas* contém apenas dois centros [4Fe-4S] e um centro do tipo [3Fe-xS]. Além disso, verificou-se também neste trabalho que esta enzima contém níquel (1 átomo-g de Ni por mole de enzima).

De entre as hidrogenases isoladas de bactérias do género *Desulfovibrio*, a hidrogenase de *D.gigas* tem sido a mais extensivamente estudada, tendo sido utilizada como protótipo das hidrogenases [NiFe]. Esta enzima é relativamente fácil de purificar, obtendo-se elevados rendimentos de purificação, é estável, mesmo na presença de oxigénio, e as características dos centros enzimáticos envolvidos têm permitido a realização de estudos espectroscópicos detalhados, nomeadamente de espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica e de Mössbauer. Em particular,

estes estudos conduziram a uma caracterização detalhada dos centros activos no estado nativo e na presença de hidrogénio, o substrato natural.

A hidrogenase de *D. gigas* foi também isolada a partir de células crescidas em meio enriquecido em isótopos de ferro (^{57}Fe) e de níquel (^{61}Ni) com propriedades espectroscópicas relevantes (Mössbauer e RPE), que levaram à optimização da utilização destas técnicas espectroscópicas.

V.1-Métodos de purificação da hidrogenase de *D. gigas*

Ao longo deste trabalho a hidrogenase de *Desulfovibrio gigas* foi diversas vezes purificada. Tentou-se simplificar e melhorar o processo de purificação anteriormente descrito na literatura (1) de modo a diminuir o número de passos do processo de purificação e, assim, sujeitar a enzima ao menor número possível de manipulações, com o objectivo de obter uma enzima com maior grau de pureza, maior actividade específica e aumentar a rapidez e o rendimento do processo.

A localização periplasmática da hidrogenase de *D. gigas* permite utilizar um processo selectivo de extracção dos componentes periplasmáticos sem ruptura das membranas celulares, conseguindo-se assim extractos enzimáticos contendo essencialmente apenas estes componentes, o que resulta numa menor contaminação da fracção activa e, por isso, numa simplificação dos passos de purificação.

Esquema 1 (1)

O método inicial de purificação é realizado anaerobicamen-

te, sob atmosfera de azoto e em meio redutor, por adição de ditionito de sódio às soluções tampão até uma concentração final de 1 mM, segundo o processo de Hatchikian et al (1).

As células são suspensas em Tris/HCl 50 mM, agitando-se para homogeneizar a solução. A suspensão é centrifugada a 35.000 g durante 30 min, colectando-se a solução sobrenadante. A extração é repetida uma vez e misturam-se ambas as soluções sobrenadantes. Esta mistura é novamente centrifugada a 120.000 g durante 2 horas e passada numa coluna de DEAE-52 equilibrada com Tris/HCl 50 mM. A coluna é então lavada com a mesma solução tampão. A fracção de hidrogenase assim eluida é adsorvida numa coluna de sílica equilibrada com a mesma solução tampão, de modo a remover o citocromo c_3 . A hidrogenase é aplicada a outra coluna de DEAE-52 equilibrada com Tris/HCl 20 mM. Após lavagem com aquela solução tampão, aplica-se um gradiente descontínuo de Tris/HCl 50-200 mM. A fracção obtida é aplicada a uma coluna de UltroGel AC44 equilibrada em Tris/HCl 20 mM. Separa-se assim a hidrogenase das fracções citocrómicas. A fracção contendo hidrogenase é aplicada em seguida numa coluna de hidroxilapatite equilibrada com Tris/HCl 10 mM e eluida com um gradiente de fosfato 5-150 mM. A fracção de hidrogenase obtida é passada novamente numa coluna de Sefacril ou de Sephadex. Obtém-se assim uma fracção de hidrogenase com uma actividade específica de $90 \mu\text{mol de H}_2 \text{ produzido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (Tabela V.1).

Esquema 2 (3)

Verificou-se que a hidrogenase no estado reduzido, obtida pelo método anterior, é bastante mais sensível ao oxigénio, sendo

por isso menos estável. Assim, as purificações passaram a realizar-se na ausência de ditionito de sódio. A purificação é realizada anaerobicamente, sob atmosfera de argon. As soluções tampão são saturadas com este gás e passa-se por cada coluna, antes de a carregar, 100 ml de solução tampão contendo ditionito de sódio 1 mM, para remover traços de oxigénio, seguindo-se uma lavagem da coluna com 100 ml de solução tampão desarejada, para remover o ditionito da coluna.

As células depois de descongeladas são centrifugadas a 30.000 g durante 20 min, recolhendo-se a solução sobrenadante. Lavam-se de seguida as células duas vezes com Tris/HCl 50 mM e combinam-se todos as soluções sobrenadantes. Este extracto é concentrado num Diaflo com uma membrana YM 30 e dialisado contra Tris/HCl 5 mM. O extracto dialisado é então carregado numa coluna de DEAE-Biogel A equilibrada em Tris/HCl 10 mM. A eluição efectua-se com um gradiente contínuo de Tris/HCl 10-250 mM (750 ml de cada). A fracção contendo hidrogenase é aplicada a uma coluna de hidroxilapatite equilibrada com Tris/HCl 150 mM. As proteínas são eluídas com um gradiente de tampão fosfato 10-250 mM (750 ml de cada). A fracção de hidrogenase é dialisada contra Tris/HCl 5 mM e carregada numa segunda coluna de DEAE-Biogel A, equilibrada em Tris/HCl 10 mM. A eluição é efectuada com um gradiente contínuo de Tris/HCl 10-200 mM (750 ml de cada). Por este processo, a partir de 280 g de células (peso húmido) obtiveram-se 104 mg de hidrogenase pura com uma razão de absorvâncias A_{400}/A_{280} de 0,28 e uma actividade específica de 90 $\mu\text{mol H}_2$ produzido $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (Tabela V.1).

Esquema 3 (4)

Este processo foi utilizado pela primeira vez na purificação da hidrogenase de células crescidas em ^{61}Ni . Realizaram-se os vários passos anaerobicamente como no Esquema 2. Imediatamente após o crescimento das células (200 g) adicionaram-se 200 ml de Tris/HCl 50 mM e congelou-se a mistura durante 48 h a -80°C . Depois do descongelamento, as células foram separadas por centrifugação a 20.000 g. O extracto solúvel foi concentrado até 150 ml num Diaflo com uma membrana YM 30 e dialisado contra 4 l de Tris/HCl 10 mM. Este método de extração revelou-se extremamente efectivo para as proteínas periplasmáticas, obtendo-se um extracto com uma actividade especifica para a hidrogenase cerca de dez vezes maior que nos esquemas anteriores (Tabela V.1). Este extracto foi carregado numa coluna de DEAE-Biogel equilibrada em Tris/HCl 10 mM. Após lavagem da coluna com a mesma solução tampão efectuou-se um gradiente linear de Tris/HCl 10 mM-250 mM (1 l de cada). A fracção contendo hidrogenase, depois de centrifugada a 19.000 g durante 15 min, foi aplicada a uma coluna de hidroxilapatite equilibrada em Tris/HCl 200 mM e eluida com um gradiente continuo de tampão fosfato 10 mM-250 mM (750 ml de cada). Por este processo obtiveram-se 70 mg de hidrogenase pura com actividade especifica de $440 \mu\text{moles de H}_2 \text{ produzido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$.

Os esquemas de purificação encontram-se resumidos na tabela V.1. Verifica-se que não só se tem diminuido significativamente o número de passos do processo mas também que com o Esquema 3 se obtém uma hidrogenase com uma actividade especifica muito superior. Contudo, qualquer destes esquemas só tem sido utilizado quando se está interessado especificamente na hidrogenase ou em

proteínas periplasmáticas. Assim, foram realizadas outras purificações em que o extracto bruto total é obtido por ruptura das células numa French Press. Este extracto, após adsorção em sílica (processo em "batch"), um processo selectivo para retirar as fracções citocrómicas, é aplicado a uma coluna de DEAE ou DEAE-Biogel. Seguem-se depois os passos referidos no Esquema 3: a fracção contendo hidrogenase, geralmente misturada com APS reductase, é carregada numa nova coluna de DEAE-Biogel e, finalmente, numa coluna de hidroxilapatite.

TABELA V.1: Esquemas de purificação da Hidrogenase de *Desulfovibrio gigas*

Esquema	Fracção	Actividade Especifica ^(a)	Recuperação %	Ref
<u>1</u>	Extracto	1,9	100	1
	1 ^a DEAE	3,7	94,8	
	Sílica	3,2	78,5	
	2 ^a DEAE	9,2	72,5	
	1 ^a Sefacril	23,4	52,9	
	HTP	66,2	49,4	
	2 ^a Sefacril	90,8	47,3	
<u>2</u>	Extracto	1,49	100	3
	1 ^a DEAE	2,60	72	
	HTP	11,00	72	
	2 ^a DEAE	90,3	54	
<u>3</u>	Extracto	11,2	100	4
	DEAE-Biogel	114,3	72	
	HTP	440	56	

(a) $\mu\text{mol H}_2$ produzido/min. mg

Dependendo das purificações, obtém-se neste passo uma hidrogenase pura ou, caso contrário, repetem-se os últimos dois passos. Por este processo têm sido obtidas fracções de hidrogenase com actividades específicas da ordem de $300 \mu\text{mol H}_2 \text{ produzido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Verificou-se também ao longo deste trabalho não ser necessário realizar a purificação em meio redutor, como inicialmente se pensava. De facto, como já foi referido, a enzima é mais sensível ao oxigénio no estado reduzido e, além disso, embora pelos processos actuais seja isolada num estado não activo, por incubação sob hidrogénio ou na presença de armadilhas para o oxigénio é possível a sua reactivação (Capítulo IV).

V.2-Characterização Fisico-Química

V.2.1-Massa Molecular

A massa molecular da hidrogenase de *D.gigas*, determinada por Hatchikian et al por ultra centrifugação (1), é de 89,5 kDa. Por electroforese em geis de poliacrilamida na presença de SDS e mercaptoetanol estes autores estimaram também a massa molecular das subunidades da hidrogenase : a enzima contém duas subunidades não idênticas com massas moleculares de 62,0 e 26,0 kDa.

V.2.2-Análise química

O conteúdo em metais e em enxofre lábil desta enzima tem sido determinado por diversos processos (Tabela V.2).

TABELA V.2: Conteúdo em metais e S* da
hidrogenase de *D.gigas* (a)

Esquema de Purificação (b)	Fe	S*	Ni	Activ. Específica (c)	Ref
<u>1</u>	12	12	--	90	1
<u>2</u>	--	--	0,7	90	3,5
<u>3</u>	11±1	--	0,9-1	440	4

a Conteúdo expresso em mole de metal por mole de enzima

b Métodos de determinação: 1- Fe- Espectrometria de absorção atômica e método da o-fenantrolina; S* - Método de Fogo e Popowski e Suhara ; 2- Ni- Espectrometria de absorção atômica e de emissão de plasma; 3- Fe, Ni- Espectrometria de emissão de plasma; c $\mu\text{mol H}_2$ produzido/min.mg

É uma proteína contendo níquel e ferro não hémico inserido em centros ferro enxofre, nas seguintes concentrações : 1 átomo-g de Ni, 11-12 átomo-g de Fe e 11-12 átomo-g de enxofre lábil S*. A tabela V.2 permite verificar que o método de purificação mais recente, além de levar á obtenção de uma enzima mais activa, conduz também a uma enzima com um teor em níquel mais elevado.

V.2.3-Espectroscopia de Visível e Ultravioleta

A hidrogenase de *D.gigas* no estado nativo (como isolada) apresenta um espectro de visível e ultra-violeta típico de proteínas com centros ferro-enxofre, com uma banda alargada a 400 nm, um ombro mal definido a 325 nm e uma banda a 280 nm (Figura V.1) . Os coeficientes de absorvidade molar são iguais a 46,5 (400 nm) e 170 (280 nm) $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (1) . A razão de absorvâncias A_{400}/A_{280} é de 0,27. Por redução sob hidrogénio a absorvância a 400 nm decresce de 30 %, enquanto por adição de ditionito de sódio se observa um decréscimo de 40 % (Figura V.1).

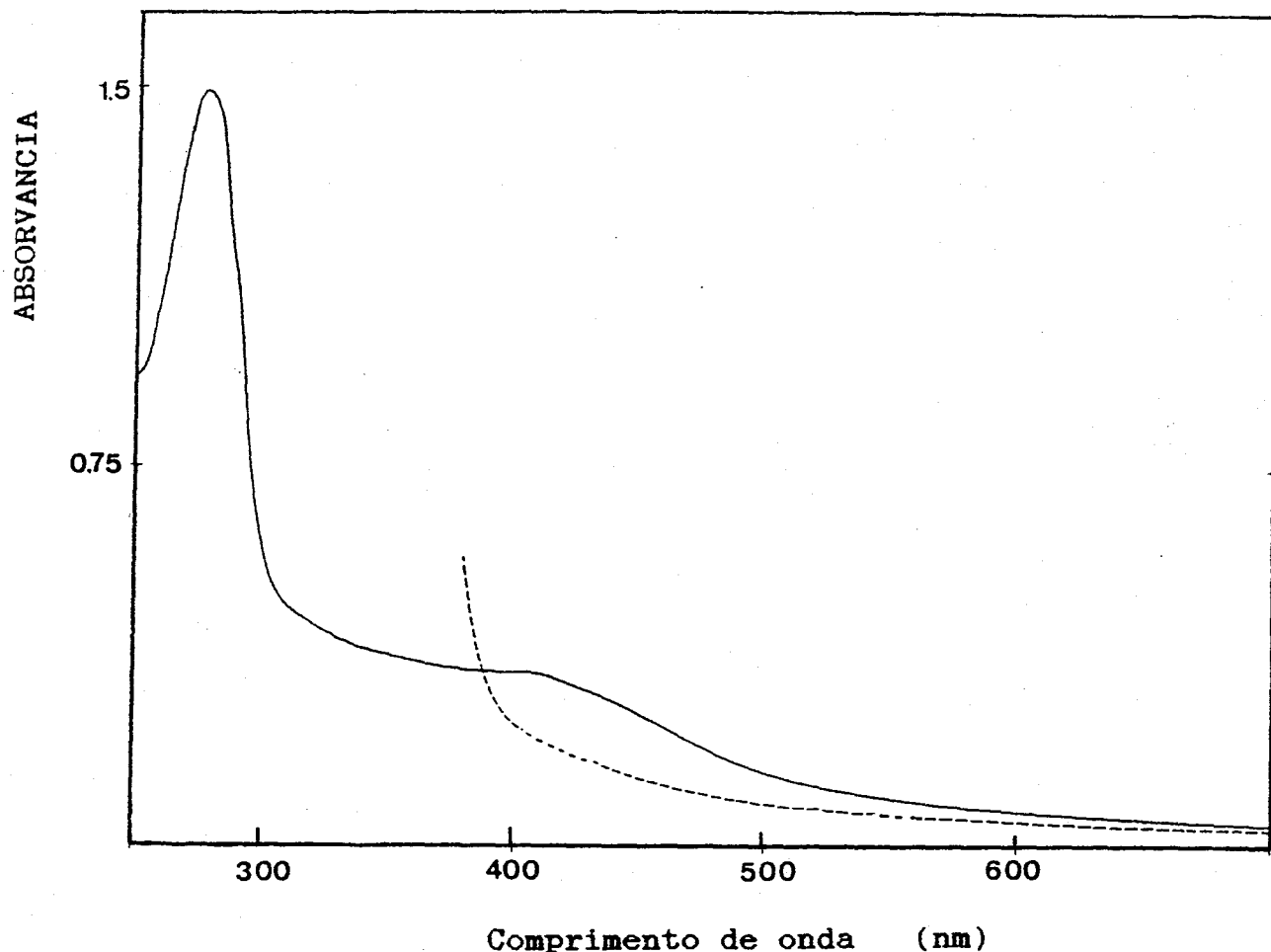


Figura V.1- Espectro de visível e ultravioleta da hidrogenase nativa de *D. gigas*, nativa (—) e reduzida com ditonito de sódio (-----)

V.3-Caracterização espectroscópica do estado nativo

A hidrogenase de *D. gigas*, no estado nativo, apresenta os sinais de RPE mostrados na figura V.2. A temperaturas inferiores a 30 K o espectro é dominado por um intenso sinal isotrópico a $g \approx 2$, que se sobrepõe a um sinal rômbico que se encontra saturado com a potência de microondas nestas condições. A temperaturas elevadas (superiores a 70 K) o espectro mostra apenas o sinal rômbico, estando o sinal isotrópico completamente alargado devido ao aumento da velocidade de relaxação com a temperatura. Observa-se ainda em ambos os espectros uma componente rômbica de mais fraca intensidade, com valores de g a 2,33, 2,16 e 2,0.

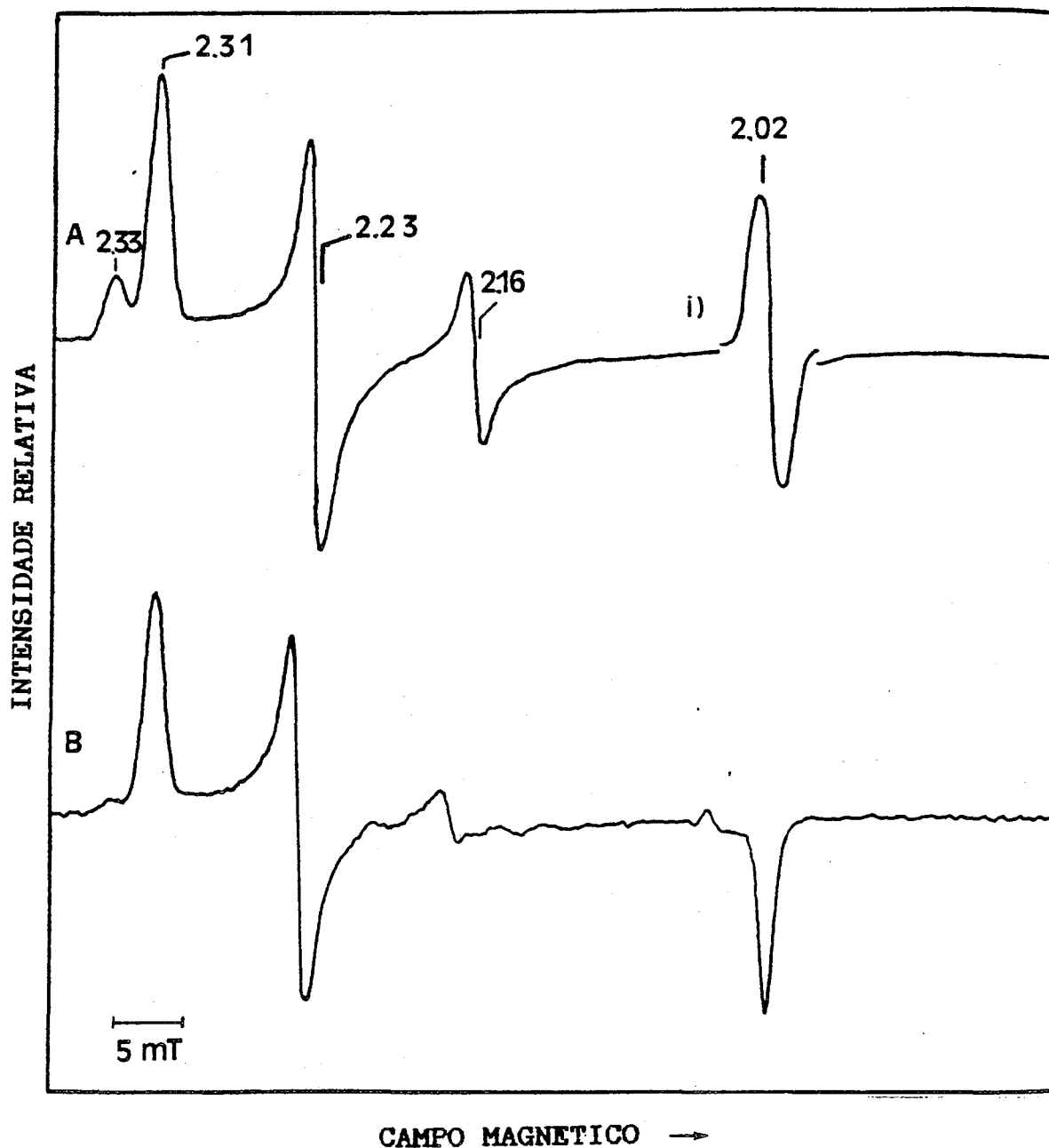


Figura V.2- Espectros de RPE da hidrogenase de *D. gigas*
no estado nativo
A- Temperatura : 8 K; B- Temperatura : 77 K
Amplitude de modulação: 0,5 mT e 0,005 mT (i)
Potência de microondas : 2 mW
Frequência: 9,34 GHz

V.3.1-Identificação do sinal isotrópico por Espectroscopia de RPE e Mössbauer

O sinal a $g=2,02$, detectado a temperaturas inferiores a 30 K corresponde a 0,89 - 1 spin/mole enzima. É um sinal praticamente isotrópico, com valores de g a 2,02, 2,00 e 1,99. O sinal de RPE da enzima isolada de células crescidas em meio enriquecido em ^{57}Fe ($I=1/2$) é alargado (largura de linha de 2,4 mT, comparada com a largura de 2,1 mT para a enzima em abundância natural de ^{57}Fe) (Figura V.3), o que demonstra inequivocamente que o sinal tem origem num centro contendo ferro. Pelas suas características espectrais pode resultar de um centro $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ ou de um centro $[3\text{Fe-xS}]_{\text{ox}}$. Contudo, o valor do potencial de redução deste centro (-70 mV, ver adiante) é compatível com a segunda possibilidade. Na figura V.3 mostra-se também o espectro de RPE do centro $[3\text{Fe-xS}]_{\text{ox}}$ da Fd II nativa de *D.gigas*. Este sinal é bastante menos isotrópico, sugerindo ligeiras diferenças estruturais ou de coordenação entre os centros $[3\text{Fe-xS}]$ destas proteínas.

TABELA V.3: Características dos sinais de RPE isotrópicos de Fd II e da Hidrogenase de *D.gigas*

Parâmetro	FdII			Hidrogenase		
Largura de linha (m T)	1,5	3,5	8,0	2.1 (largura total)		
Valor de g	2,02	2,00	1.97	2,02	2,00	1,99
Referência	5			este trabalho		

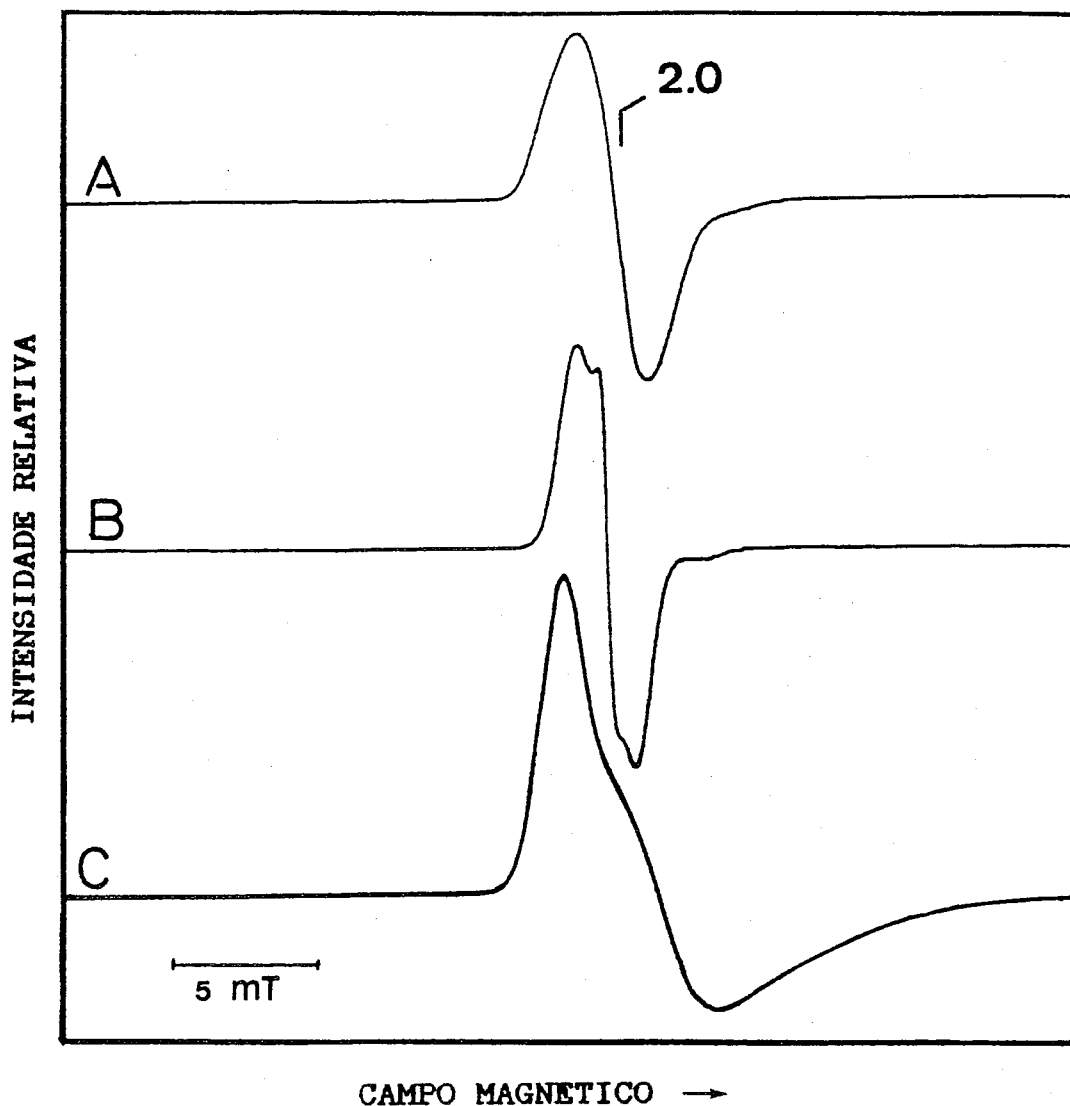


Figura V.3: Espectros de RPE do sinal isotrópico da hidrogenase e da Fd II de *D.gigas*
 A- Hidrogenase enriquecida em ^{57}Fe
 B- Hidrogenase em abundância natural de ^{57}Fe
 C- Fd II, em abundância natural de ^{57}Fe
 Temperatura : 8 K; Amplitude de modulação: 1 mT;
 Potência de microondas: 2 mW; Frequência: 9,41 GHz

O espectro de Mössbauer da enzima no estado nativo, isolada de células crescidas em abundância natural de ^{57}Fe , obtido a 4,2 K e na presença de um campo paralelo de 50 mT contém duas componentes espectrais: um intenso doubleto de quadrupolo (compo-

nente A) e uma componente magnética (Componente B, Figura V.4). O dobleto central corresponde a 70-80% da absorção total e os seus parâmetros (desdobramento de quadrupolo de 1,05 mm/s e desvio isomérico de 0,42 mm/s) são típicos de centros $[4Fe-4S]^{2+}$ (7). Uma análise detalhada deste espectro é impedida pela fraca resolução obtida, mas, por comparação com o espectro de Mössbauer da hidrogenase de *D. desulfuricans* (estirpe 27774), isolada de células crescidas em meio enriquecido em ^{57}Fe (8), verifica-se que ambos os sinais são sobreponíveis.

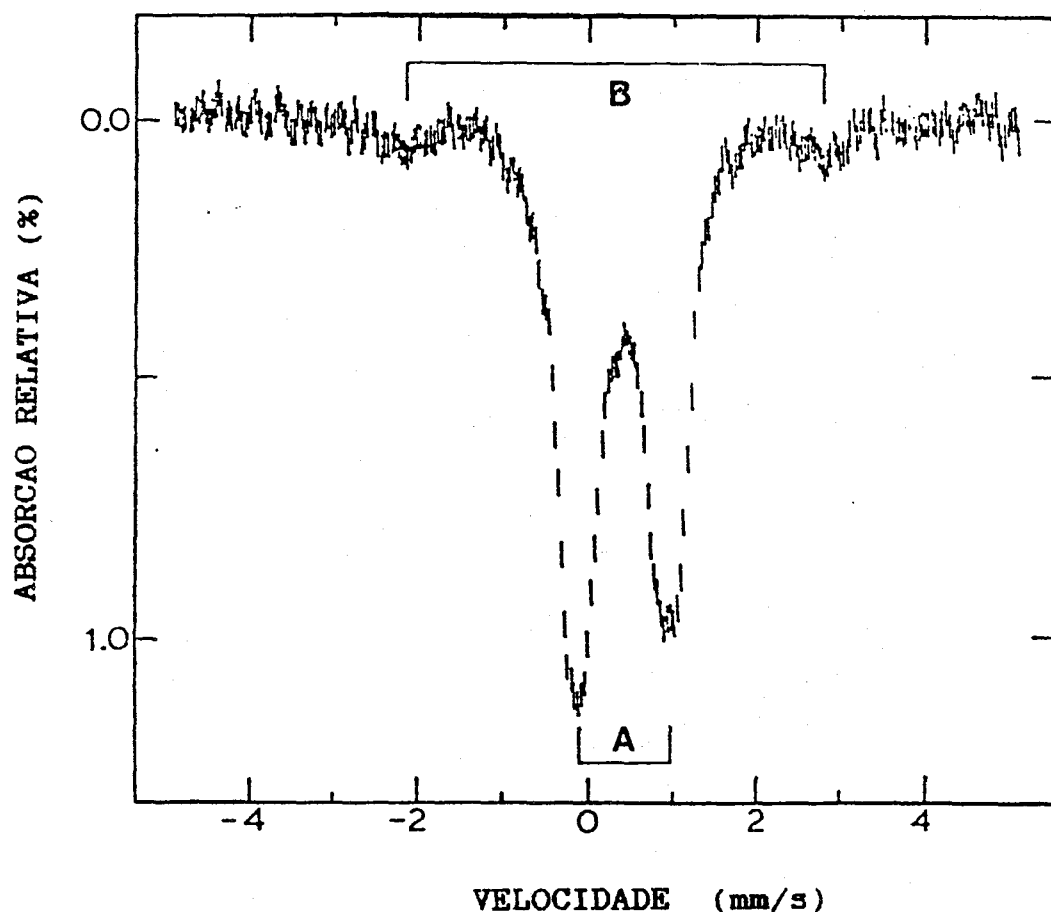


Figura V.4: Espectro de Mössbauer da hidrogenase de *D. gigas* no estado nativo em abundância natural de ^{57}Fe . Temperatura: 4,2 K; Campo magnético aplicado: 50 mT paralelo à radiação γ . Componentes espectrais indicados pelos parêntesis

O sinal da hidrogenase de *D. desulfuricans* foi analisado em detalhe (8) concluindo-se que corresponde à presença de dois centros $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ e de um centro $[3\text{Fe-xS}]_{\text{ox}}$. Este resultado permite concluir que a hidrogenase de *D. gigas* no estado nativo contém também centros deste tipo.

Posteriormente isolou-se a hidrogenase de *D. gigas* de células crescidas em meio enriquecido em ^{57}Fe (9) (enriquecimento superior a 95 %). O espectro de Mössbauer desta enzima traçado a 4,2 K na presença de um campo magnético de 50 mT aplicado paralelamente à radiação γ encontra-se na figura V.5. Revelam-se claramente duas subcomponentes espectrais: uma componente magnética entre -2,5 mm/s e +3 mm/s e um dobleto de quadrupolo central, com parâmetros $\Delta E_Q = 1,05$ mm/s e $\delta = 0,42$ mm/s, característicos de centros $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. Este dobleto representa cerca de 70% da absorção total o que, de acordo com o conteúdo em ferro da proteína (11-12 moles de ferro por mole de enzima), indica a presença de dois centros $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ por molécula de enzima.

O padrão de absorção da componente magnética depende fortemente da direcção do campo aplicado, pelo que esta componente deve estar associada a um espectro de RPE intenso (sinal a $g=2,02$). O espectro de diferença dos sinais registados a campo paralelo (Figura V.5-A) e perpendicular (Figura V.5-B) à radiação γ mostra dois pares de transições com $\Delta m=0$, indicando que pelo menos dois iões ferro estão associados à componente magnética. O dobleto de quadrupolo é cancelado, de acordo com o seu diamagnetismo, isto é, o espectro desta componente é independente da direcção do campo aplicado.

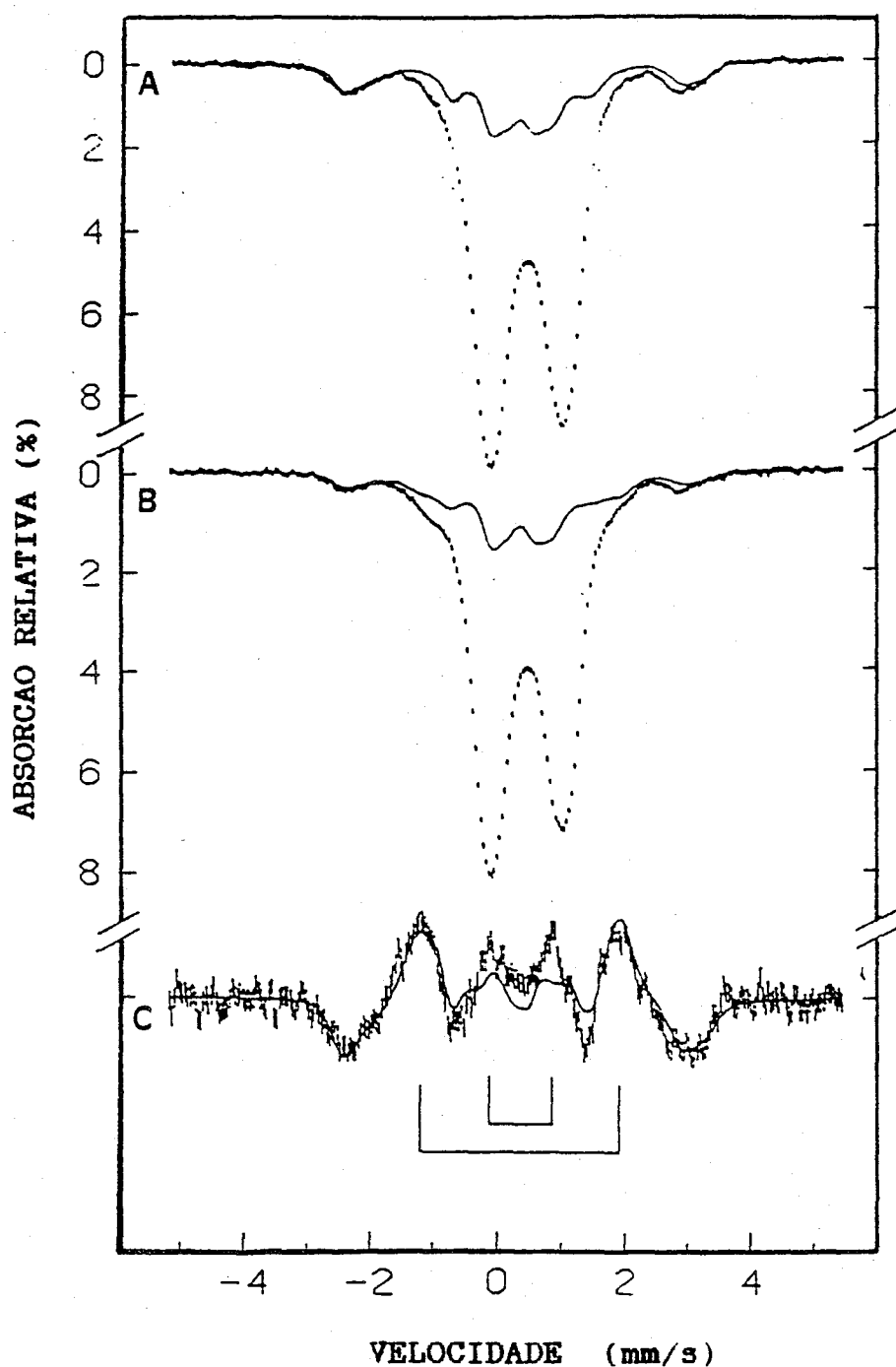


Figura V.5- Espectro de Mössbauer da hidrogenase de *D. gigas* enriquecida em ^{57}Fe (9)
 Temperatura : 4,2 K. Campo aplicado: 50 mT, paralelo (A) e perpendicular (B) à radiação γ
 C-Espectro de diferença A-B. Linhas a cheio: espectros simulados (27 % da absorção total)
 Os parêntesis indicam as transições com $\Delta m=0$ associadas ao centro $[\text{3Fe-xS}]$

As características da componente magnética , em conjunto com o desdobramento magnético total de cerca de 5,5 mm/s e com a existência do sinal de RPE isotrópico a $g=2,02$ permitem atribuir este sinal de RPE e o espectro de Mössbauer magnético à presença de um centro $[3\text{Fe-xS}]_{\text{ox}}$. A temperaturas superiores a 20 K a relaxação electrónica deste centro é rápida, pelo que a componente magnética colapsa num duplete de quadrupolo com parâmetros $\Delta E_Q=0,7$ mm/s e $\delta=0,36$ mm/s típicos de Fe(III) de spin elevado, coordenado essencialmente a átomos de enxofre numa geometria tetraédrica. É necessário postular a presença de um terceiro ião ferro, pois dois iões Fe(III) com $S=1/2$ não podem acoplar de modo a resultar um sistema com $S=1/2$. A componente espectral deste terceiro ião encontra-se sob o intenso duplete de quadrupolo que domina o espectro. Pode assim dizer-se que o centro $[3\text{Fe-xS}]$ da hidrogenase de *D.gigas* é semelhante aos centros $[3\text{Fe-xS}]$ presentes na Fd II de *D.gigas* (6) e na Fd I de *A.vinelandii* (10), isto é, consiste em três iões férricos de spin elevado acoplados, resultando um sistema com spin total $S=1/2$. Contudo, e de acordo com o que se verifica por espectroscopia de RPE, o desvio isomérico para a hidrogenase é bastante superior, o que pode indicar que a coordenação dos iões férricos pode ser diferente nestes centros, eventualmente contendo ligandos azotados ou oxigenados. É de referir ainda que o desvio isomérico obtido para o centro $[3\text{Fe-xS}]$ da hidrogenase de *D.desulfuricans* (estirpe 27774) é também de 0,36 mm/s (8), sugerindo uma semelhança dos centros $[3\text{Fe-xS}]$ de ambas as hidrogenases (Tabela V.4).

TABELA V.4: Parâmetros de Mössbauer para os centros [3Fe-xS]_{ox} das hidrogenases de *D.gigas* e *D.desulfuricans* e da Fd II de *D.gigas*

Enzima	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Ref.
Fd II	0,27	0,54	6
Hidrogenase <i>D.gigas</i>	0,36	0,70	7,9
Hidrogenase <i>D.desulfuricans</i> (27774)	0,36	0,70	8

A componente magnética do sinal de Mössbauer pode ser simulada com uma intensidade igual a 27% da absorção total, concluindo-se que a hidrogenase no estado nativo contém um centro [3Fe-xS] oxidado.

V.3.2-Identificação Inequivoca do sinal rômico :- Substituição isotópica por ⁶¹Ni e estudos por RPE

O sinal rômico detectado para a hidrogenase de *D.gigas* a temperaturas elevadas tem valores de g a 2,31 , 2,23 e 2,02, tendo sido designado por Sinal-Ni A. Em algumas preparações da enzima observa-se ainda uma componente de menor intensidade, com valores de g a 2,33 , 2,16 e ≈ 2 (Sinal-Ni B) (Figura V.6). Por integração destes sinais obtem-se, conforme as preparações, 0,3 a 0,9 spin/mol de enzima.

Estes sinais são idênticos ao observado por Lancaster em membranas de *Mb.bryanti* (11,12), reunindo uma série de características que não permitem atribui-los a iões metálicos geralmente encontrados em sistemas biológicos : todos os valores de g são

superiores a 2, os sinais apresentam relaxação lenta e não se observa estrutura hiperfina. Assim, excluem-se o Fe, Mo, Co e Cu, de entre aqueles iões de metais de transição que podem dar origem a sinais de RPE, o que levou Lancaster, por comparação com compostos inorgânicos de níquel, mencionados no Capítulo II, a atribuir o sinal rômico a um ião Ni(III) de spin baixo ($S=1/2$), coordenado numa geometria octaédrica com distorção tetragonal.

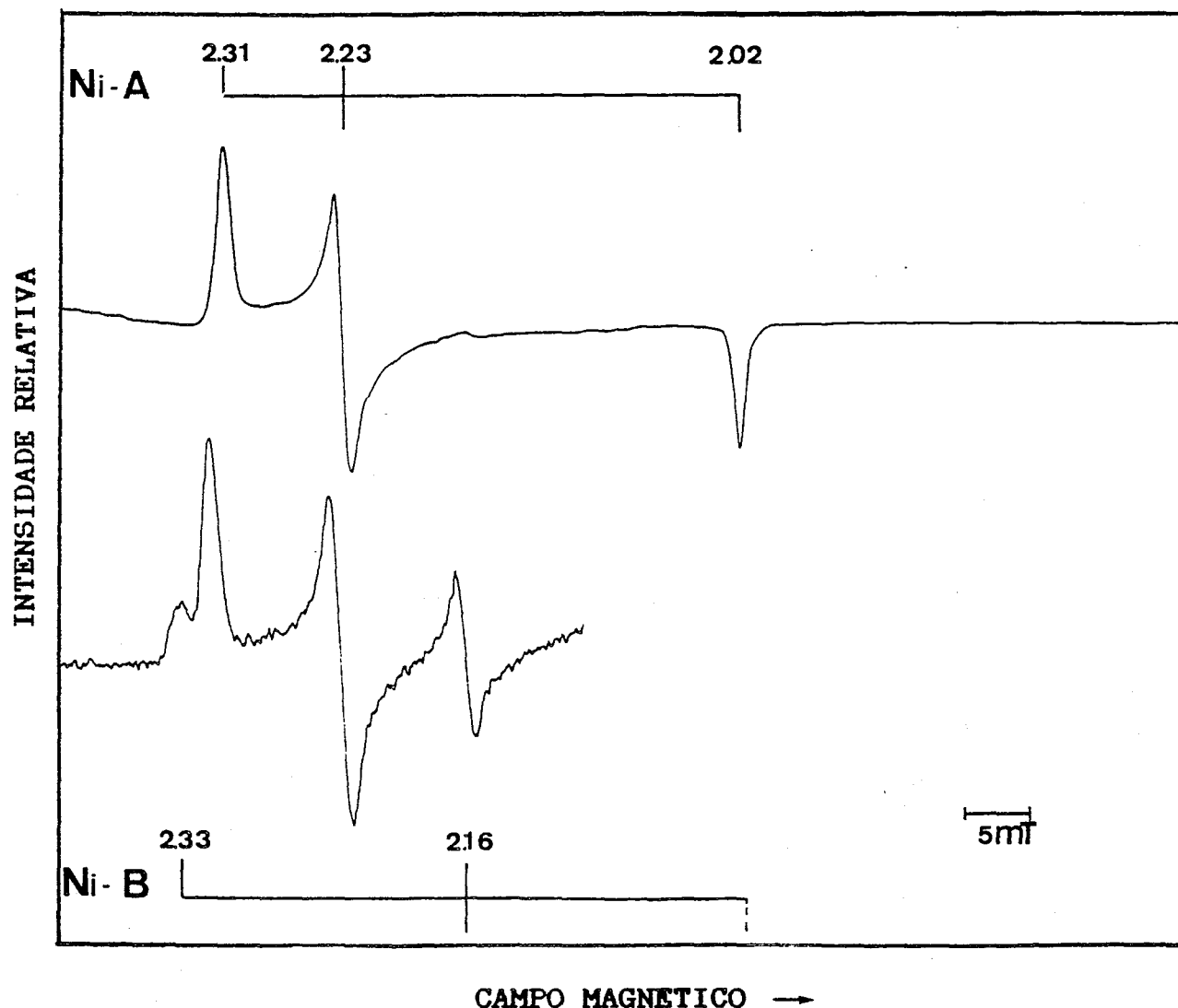


Figura V.6: Sinais de RPE de diferentes preparações da hidrogenase de *D.gigas*
 Temperatura : 77 K; Amplitude de modulação : 1 mT
 Potência de microondas : 2 mW; Frequência : 9,28 GHz

A identificação inequívoca destes sinais conseguiu-se por obtenção de hidrogenase purificada a partir de células crescidas em meio enriquecido em ^{61}Ni (4), um isótopo de níquel com um momento magnético de spin nuclear $I=3/2$. O sinal de RPE desta enzima no estado nativo (Figura V.7) apresenta um alargamento significativo a $g=2,31$ (2,6 mT, comparado com 1,6 mT para a amostra não enriquecida) e estrutura hiperfina resolvida a $g=2,23$ e $g=2,02$.

Na região de $g=2$ observam-se quatro linhas igualmente espaçadas, estando as duas linhas exteriores separadas por 8 mT. O sinal centrado a $g = 2,02$ resulta de enzima não enriquecida. Estas características a $g=2,02$ permitem estimar um enriquecimento isotópico da ordem de 60 % (4).

A amostra de hidrogenase enriquecida em ^{61}Ni tem uma percentagem muito baixa da componente a $g=2,33$. No entanto, por ciclos de redução sob H_2 seguida de reoxidação anaeróbica desta hidrogenase na presença de citocromo c_3 tetrahémico de *D.gigas* (ver adiante) obteve-se uma amostra no estado oxidado que apresenta apenas um sinal de RPE com valores de g a 2,33, 2,16 e 2,02 onde se observa um alargamento a g_x e estrutura hiperfina a g_y e g_z (Figura V.8), o que permite também atribuir inequivocamente o sinal a $g=2,33$ a um centro de níquel paramagnético. Os valores das constantes hiperfinas determinadas a partir destes espectros e por simulação espectral (ver Apêndice) apresentam-se na Tabela V.5.

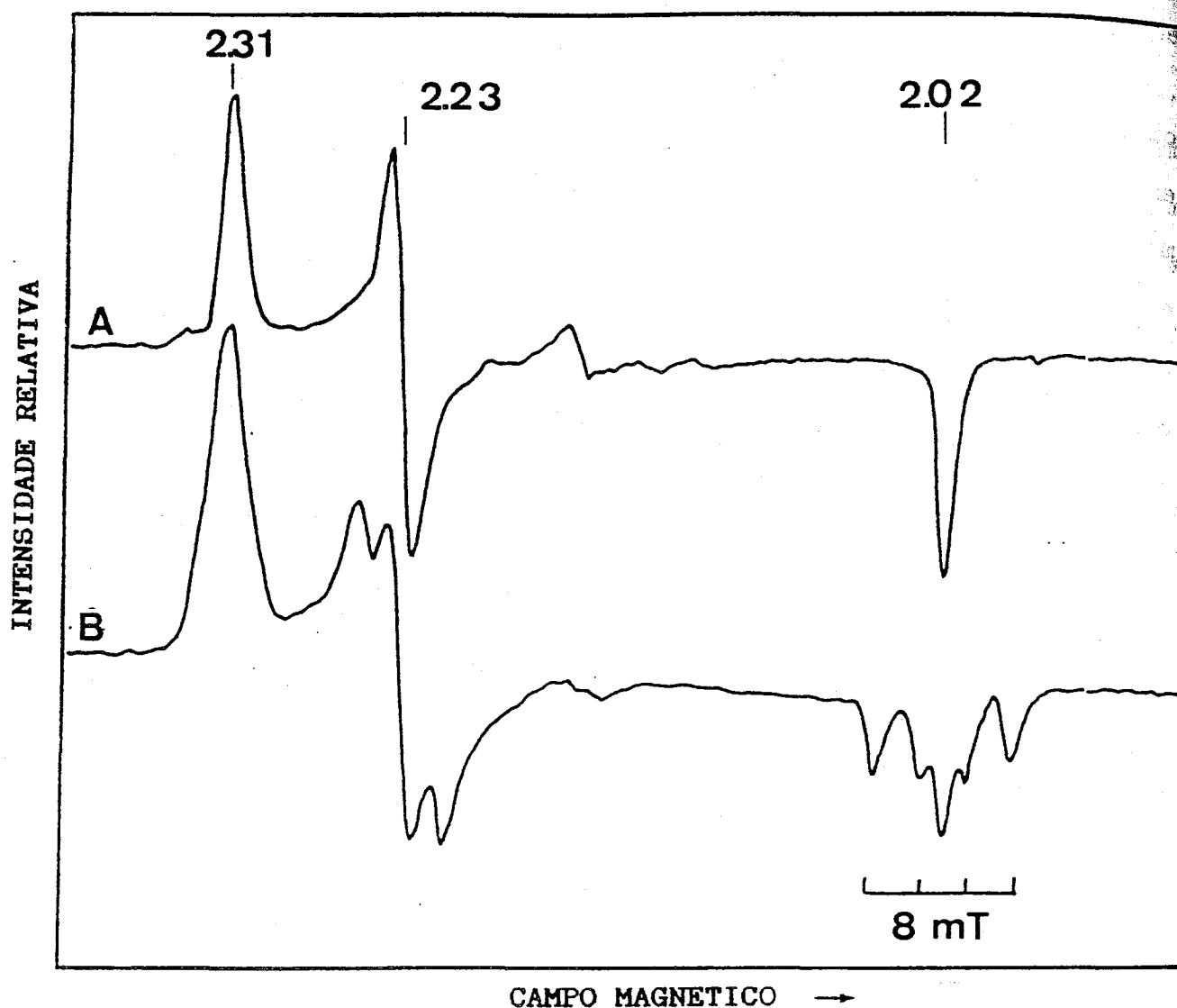


Figura V.7- Sinais de RPE da hidrogenase de *D. gigas* nativa em abundância natural de ^{61}Ni (A) e enriquecida em ^{61}Ni (B)
 Temperatura: 100 K; Potência de microondas: 0,63 (A) e 6,3(B) mW ;Modulação: 0,4 mT; Frequência: 9,256 GHz

E ainda de referir que a integração destes sinais de níquel corresponde, em algumas amostras, a valores inferiores à quantidade de níquel detectado quimicamente, indicando que em algumas preparações da enzima parte do níquel presente na hidrogenase no estado nativo se encontra numa forma silenciosa em RPE.

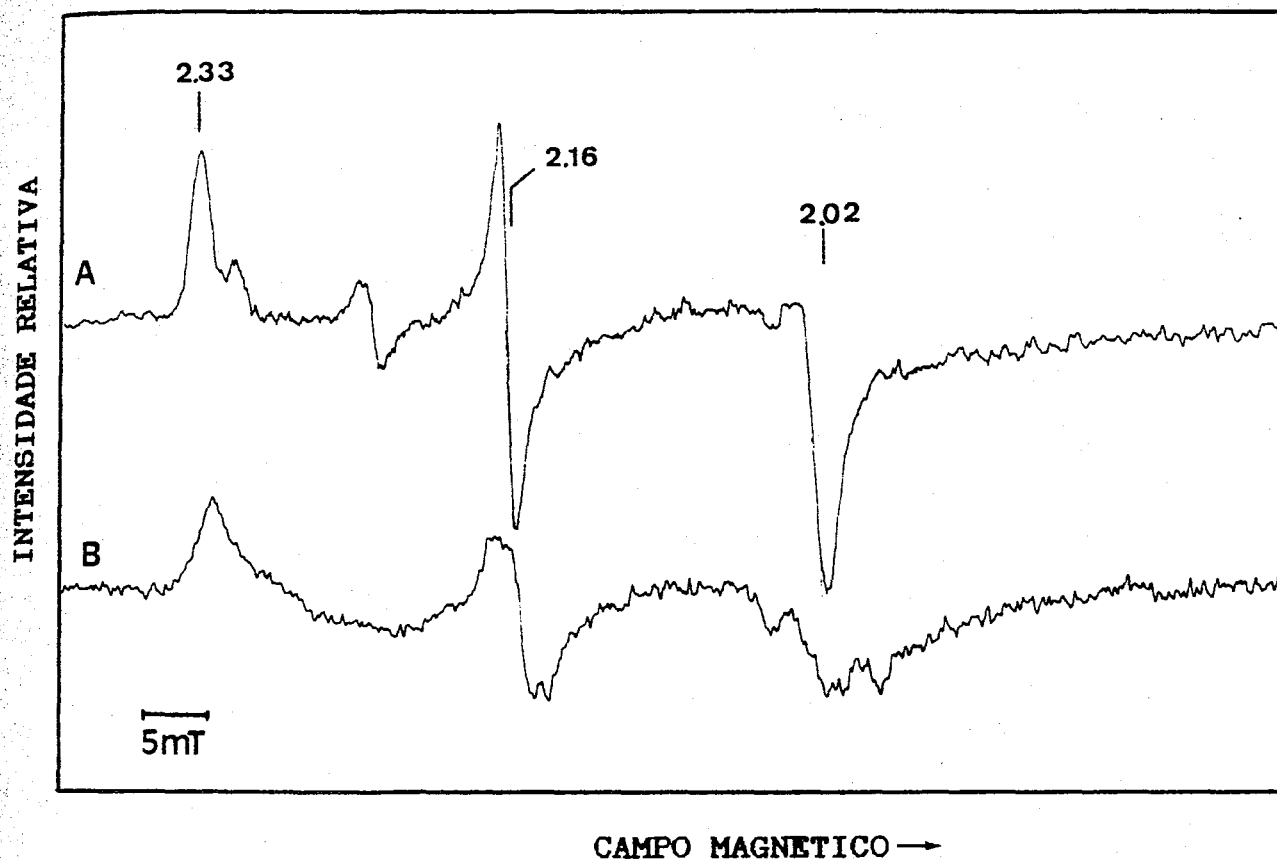


Figura V.8: Sinais de RPE da Hidrogenase de *D. gigas* após ciclos de redução/reoxidação
 A- Hidrogenase não enriquecida em ^{61}Ni ;
 B- Hidrogenase enriquecida em ^{61}Ni
 Outras condições como na Fig. V.6

V.3.2.1-Simulação do sinal de RPE de níquel Ni-A

O sinal Ni-A foi simulado (ver Apêndice), de modo a determinar mais correctamente os parâmetros espectrais. Os espectros simulados são comparados com os experimentais na figura V.9. Os parâmetros utilizados encontram-se na tabela V.5.

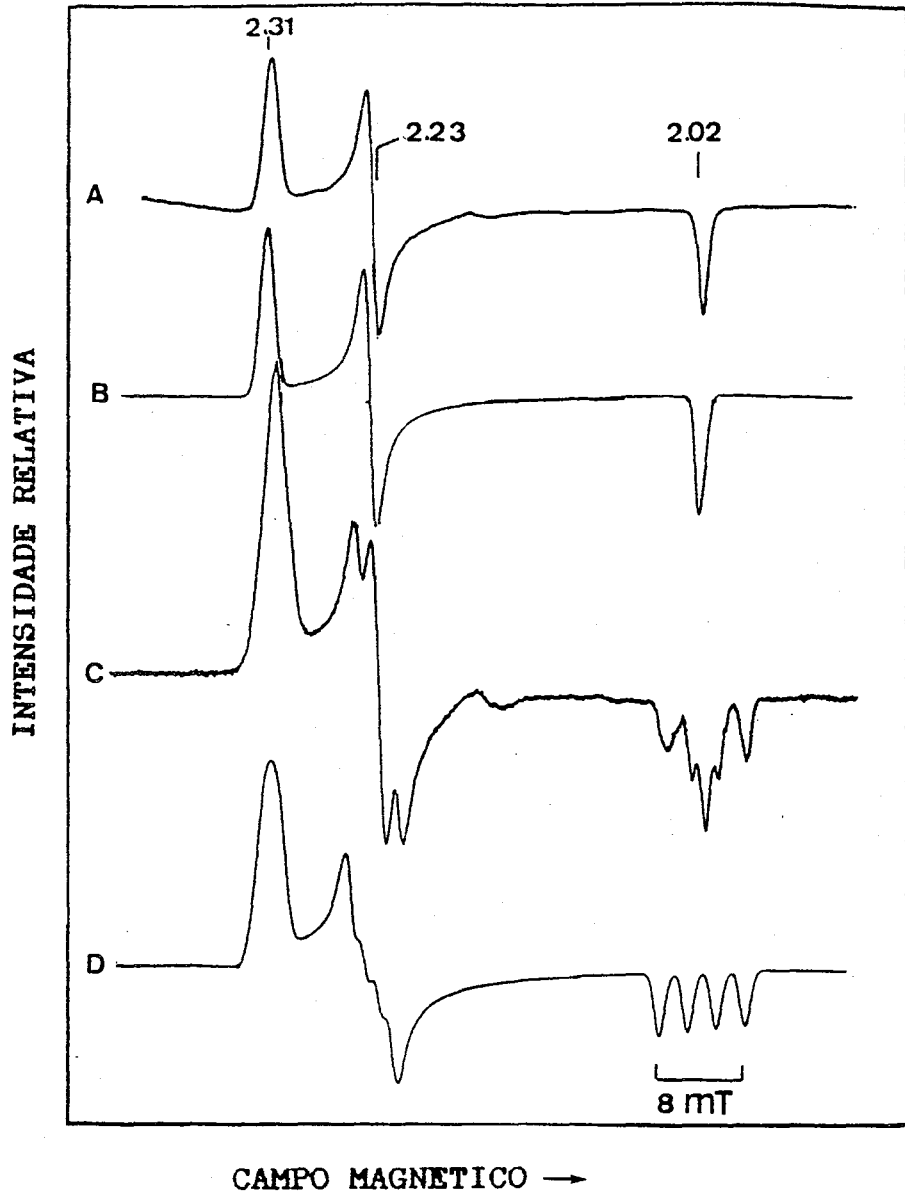


Figura V.9: Sinal de RPE de níquel Ni-A da hidrogenase de *D.gigas*. A,B- Abundância natural de ^{61}Ni ; C,D- Enriquecida em ^{61}Ni ; A,C-Sinal real; B,D-sinal simulado. Parâmetros de simulação indicados na tabela V.5. Temperatura: 77 K; Potência: 2 mW; Frequência: 9,28 GHz (A,B) e 9,26 GHz (C,D); Modulação: 1 mT

TABELA V.5: Parâmetros de acoplamento hiperfino nos sinais de Ni da hidrogenase de *D.gigas*

Sinal (valor de g)	Largura de linha (a)					
	W_{xx}	W_{yy}	W_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz} (a)
<u>Sinal Ni-A</u> (b) 2,31 2,23 2,02						
Abundância natural ^{61}Ni	1,6	1,47	1,2	--	--	--
Enriquecida em ^{61}Ni	1,6	1,47	1,2	7,5	15	26
<u>Sinal Ni-B</u> 2,33 2,16 2,02						
Abundância natural ^{61}Ni	1,9	1,5	2,7	--	--	--
Enriquecida em ^{61}Ni	3,1	--	2,5	10,3	15	26

(a) valores em mT; (b) Valores determinados por simulação

V.3.2.2-Relaxação dos sinais de RPE de níquel

Foram realizados alguns estudos de modo a caracterizar a relaxação dos sinais de Níquel A e B.

- Variação com a temperatura -

Na figura V.10 mostra-se a variação da intensidade do sinal Ni-A com a temperatura, entre 4 e 77 K. Verifica-se que a temperatura óptima de detecção deste sinal se encontra entre 35 e 70 K.

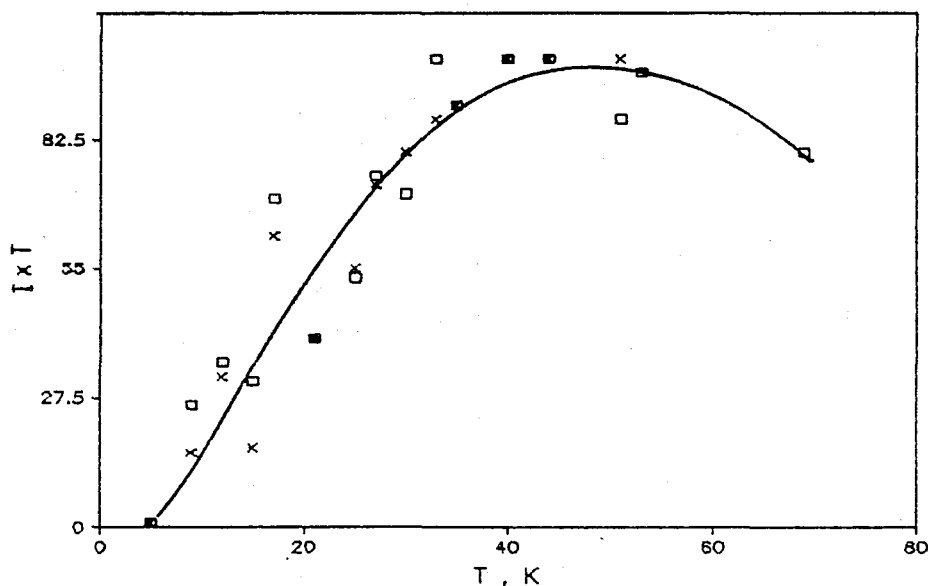


Figura V.10 : Variação da intensidade do sinal Ni-A com a temperatura
(□) $g=2,31$; (X) $g=2,23$. Potência de microondas: 2 mW

Ao valor de potência de microondas utilizado (2 mW) o sinal encontra-se saturado a baixas temperaturas; a temperaturas superiores a 77 K começa a observar-se um ligeiro alargamento das linhas do sinal, devido ao aumento da velocidade de relaxação. Os dados indicam que a espécie de níquel associada a este sinal tem um comportamento de relaxação lenta.

- Variação com a potência de microondas-

A variação da intensidade dos sinais de Ni-A e Ni-B com a potência da radiação de microondas a várias temperaturas encontra-se na figura V.11.

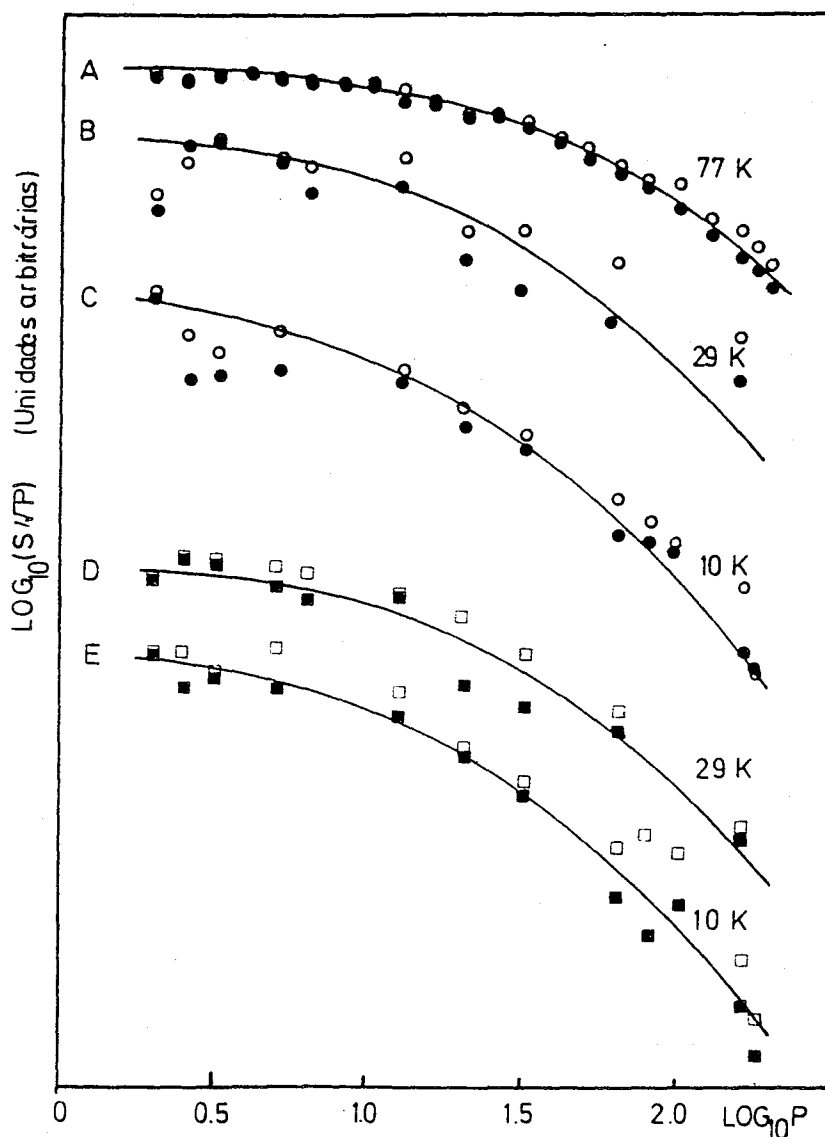


Figura V.11- Variação da intensidade dos sinais de RPE Ni-A (A-C) e Ni-B (D-E) com a potência de microondas
Temperatura: A-77 K; B-29 K; C-10 K; D-29 K; E-10 K
Curvas a cheio traçadas com os parâmetros indicados na Tabela V.6 .

(●) $g=2,31$; (○) $g=2,23$; (□) $g=2,33$; (■) $g=2,16$

Os dados experimentais foram ajustados a curvas teóricas com a equação seguinte (11)

$$S/\sqrt{P} = 1/(1+P/P_{1/2})^{b/2}$$

onde S é a intensidade do sinal, P a potência da radiação de microondas, $P_{1/2}$ a potência de meia saturação e b o parâmetro de não homogeneidade (ver Apêndice). Os valores de $P_{1/2}$ obtidos apresentam-se na tabela V.6.

TABELA V.6: Potência de meia-saturação dos sinais Ni-A e Ni-B

Sinal	T (K)	$P_{1/2}$ (mW)
<u>Ni-A</u>	10	20
	29	29
	77	61
<u>Ni-B</u>	10	23
	29	33

Valores obtidos por regressão quadrática, para valores de $b=1,4 \pm 0,1$

Verifica-se que os sinais de RPE Ni-A e Ni-B apresentam uma relaxação semelhante às temperaturas estudadas.

V.4-Estados intermediários de redução gerados sob Hidrogênio ou ditionito de sódio

A enzima hidrogenase está envolvida em reacções de transferência electrónica, sendo de esperar que os centros metálicos da enzima sofram transformações redox durante o ciclo catalítico. Assim, através das espectroscopias de RPE e de Mössbauer estudou-se o comportamento desses centros na presença do substrato natural $-H_2-$ ou de um redutor químico -ditionito de sódio.

V.4.1-Evolução dos sinais de RPE a 77 K na presença de H₂

Na figura V.12 apresenta-se a evolução dos sinais de RPE da hidrogenase de *D.gigas* a 77 K após tempos crescentes de incubação sob hidrogénio. A esta temperatura apenas os sinais de níquel são detectáveis, estando os sinais de centros ferro-enxofre completamente alargados devido à diminuição dos tempos de relaxação com a temperatura. Ocorrem uma série de transformações no espectro: os sinais presentes no estado nativo desaparecem, atingindo-se um estado praticamente silencioso em RPE, com um fraco sinal isotrópico a $g=2,0$ (Figura V.12-B); o desaparecimento deste sinal é acompanhado pelo desenvolvimento de um novo sinal rômbico (Sinal-Ni C), com valores de g a 2,19 , 2,14 e 2,02 (Figura V.12-C-E). Este sinal passa por um máximo de intensidade e, ao fim de tempos de incubação longos sob hidrogénio, atinge-se novamente um estado de RPE praticamente silencioso a esta temperatura (Figura V.12-E).

Deve referir-se que esta experiência de incubação sob hidrogénio, bem como as que serão referidas neste capítulo mais adiante, foram realizadas sem se efectuar um controlo rigoroso dos tempos de incubação. Devido ao modo experimental como estas experiências foram realizadas e à verificação de que os tempos necessários para se atingir diversos estados da enzima dependem criticamente do estado da enzima e variam conforme a preparação, não teria grande significado referir os intervalos de tempo envolvidos nestes ensaios. Por exemplo, o sinal a $g=2,19$ pode ser atingido em 1/2 h ou apenas ao fim de 24 h, conforme a preparação usada; além disso, após activação da enzima, este mesmo estado

pode ser atingido em poucos minutos (ver adiante ciclos de acti-
vação).

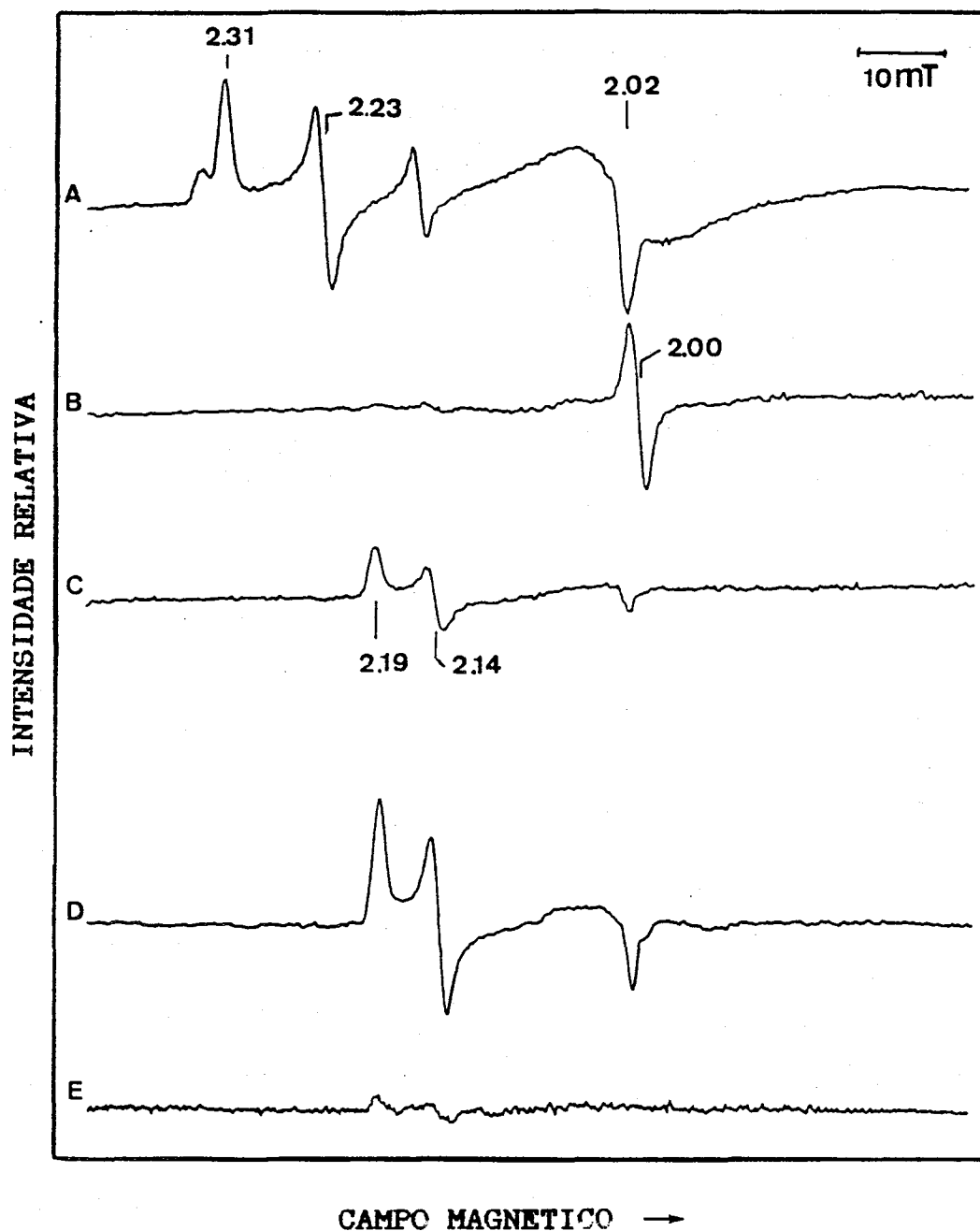


Figura V.12- Espectros de RPE da Hidrogenase
de *D. gigas* sob H_2
A-Estado nativo ; B-E -Tempos de incubação
crescentes sob H_2 . Temperatura : 77 K;
Frequência: 9.28 GHz; Amplitude de modu-
lação: 1 mT; Potência de microondas: 2 mW
Ganho variável

V.4.2-Identificação do sinal de RPE a $g=2.19$

A experiência referida na alínea anterior foi efectuada também com hidrogenase enriquecida em ^{61}Ni . O sinal intermediário a $g=2.19$ (Figura V.13-B) apresenta as linhas a 2,19 e 2,14 alargadas e observam-se quatro linhas de desdobramento hiperfino a $g=2.02$. Este resultado permite identificar a espécie que origina o sinal como um ião níquel com spin $S=1/2$ (Ni(I) ou Ni(III)). Por integração deste sinal nos pontos de intensidade máxima obtém-se um valor de 0,4-0,6 spin/mol, correspondente a 40-60% do níquel detectado quimicamente. Contudo, o valor exacto de intensidade máxima deste sinal não é ainda perfeitamente conhecido.

O sinal Ni-C foi obtido em amostras de hidrogenase enriquecida em ^{57}Fe , não se detectando qualquer alargamento das larguras de linha deste sinal por interacção hiperfina com o núcleo de ^{57}Fe ($I=1/2$) (9).

TABELA V.7: Parâmetros de RPE do Sinal Ni-C

Valores de g - 2,19 2,14 2,02

Condições	Largura de linha ^(a)			A ^(a)		
	W_{xx}	W_{yy}	W_{zz}	xx	yy	zz
Abundância natural ^{61}Ni						
H_2O	1,9	1,7	1,6	--	--	--
D_2O	1,65	1,8	--	--	--	--
Enriquecida em ^{61}Ni (H_2O)	2,1	1,8	2,0	--	--	2,7

(a) valores em mT

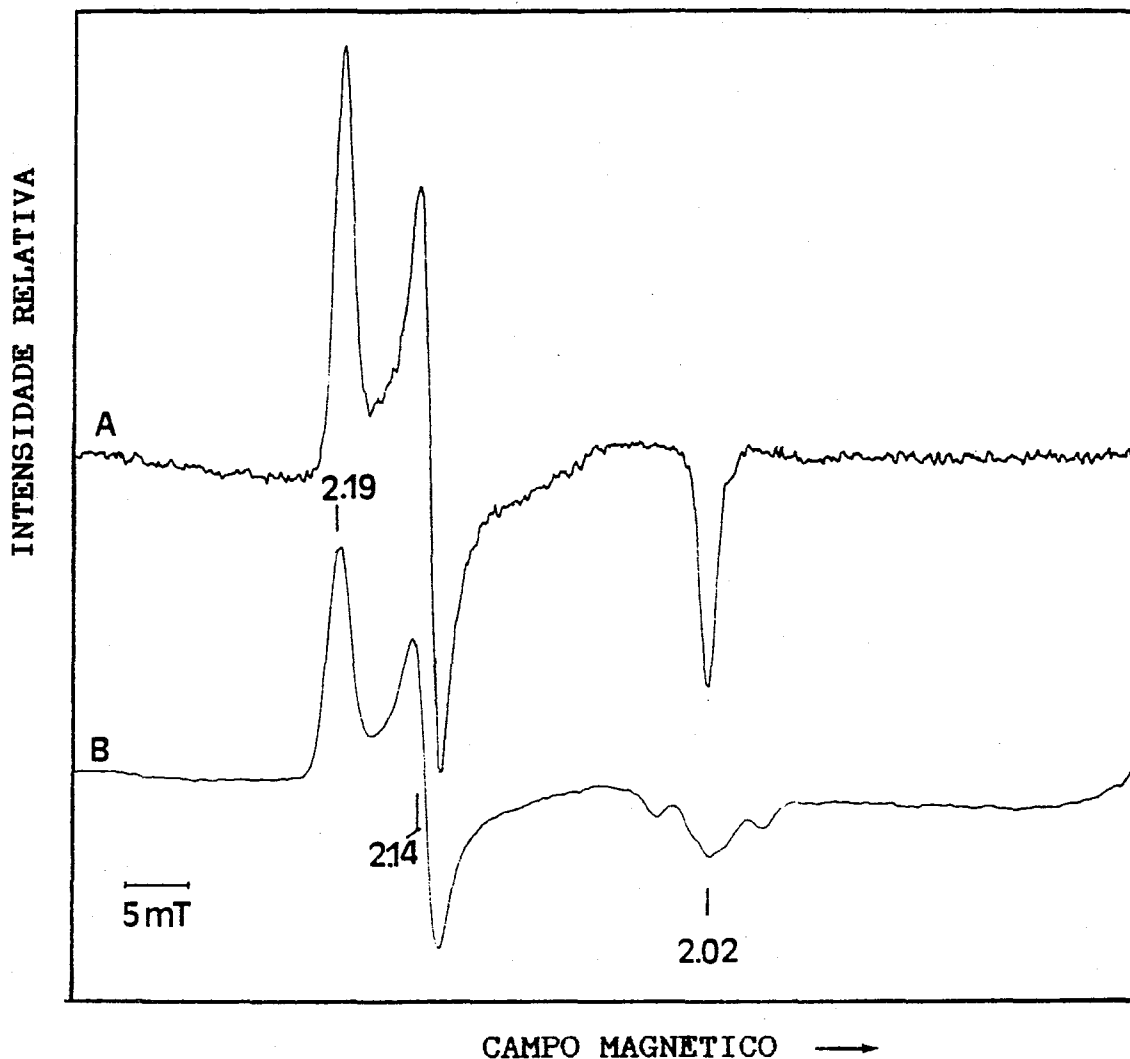


Figura V.13- Sinal a $g=2,19$ da hidrogenase de *D.gigas* reduzida sob hidrogênio

A-Abundância natural ^{61}Ni ;

B-Enriquecida em ^{61}Ni ;

Temperatura : 77 K; Potência de microondas: 2 mW

Frequência: 9,28 GHz; Modulação: 1 mT

Foram preparadas amostras da hidrogenase de *D.gigas* em D_2O , reduzidas sob hidrogênio. Observou-se que as larguras de linha a $g=2,19$ e a $g=2,14$ são ligeiramente menores nestas condições (cerca de 0,2 mT, Tabela V.7), o que pode indicar a presença de um ligando hidreto no centro correspondente a este sinal. Note-se

que a possível presença da espécie Ni-D resultaria apenas da reacção de permuta H_2/D^+ , pelo que o sinal detectado corresponderia provavelmente a uma mistura de espécies Ni-D e Ni-H. De qualquer modo, o alargamento observado é muito pequeno, pelo que este resultado deve ser apenas encarado como compatível com a formação de um complexo hidreto e não como uma prova desta hipótese.

Na figura V.14 mostra-se a dependência com a potência da radiação de microondas da intensidade do sinal de RPE Ni-C, a 77 K. Por regressão não linear da equação atrás apresentada (ver Apêndice), obteve-se um valor de $P_{1/2}$ de 69 mW ($b=1,1$).

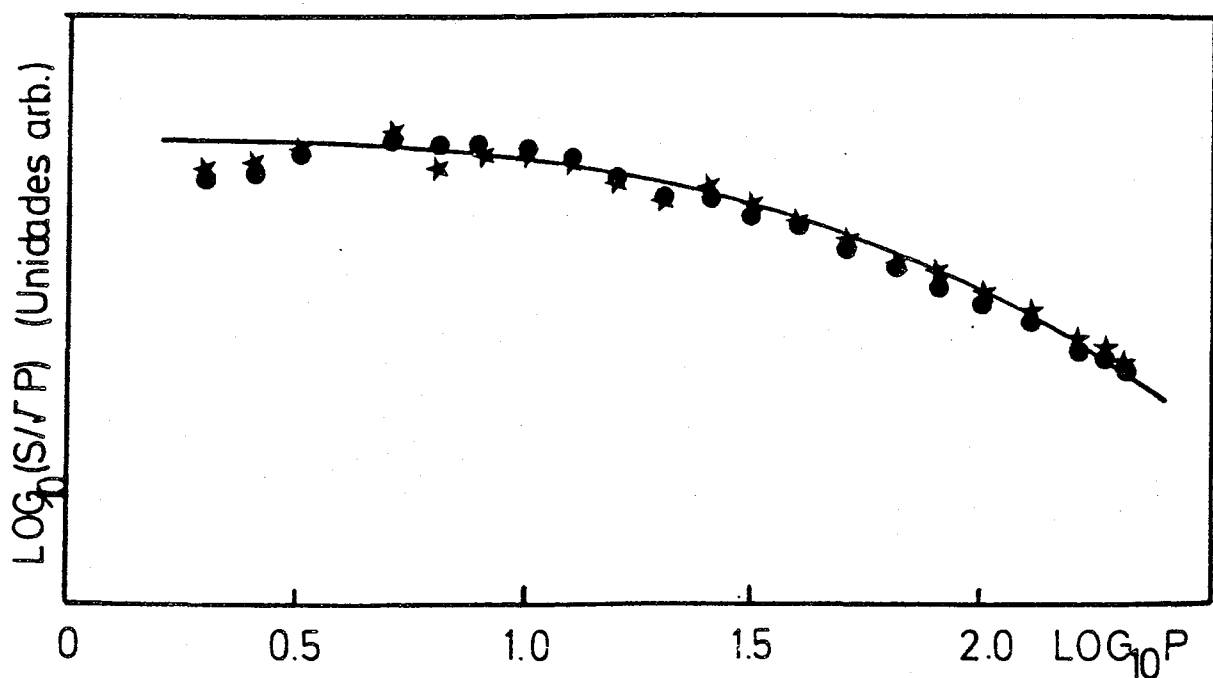


Figura V.14: Variação da intensidade do Sinal Ni-C com a potência da radiação de microondas, a 77 K (●) $g=2,19$; (★) $g=2,14$. Curva a cheio obtida para $P_{1/2}=69$ mW e $b=1,1$

Com base nestes resultados preliminares pode dizer-se que, durante o ciclo catalítico da enzima, o centro de níquel sofre diversas transformações, que podem ser de oxidação-redução, de conformação ou de coordenação ou mesmo de todos estes tipos. Mais adiante serão discutidas detalhadamente várias hipóteses que permitam explicar estes resultados.

V.4.3-Estudos do sinal de RPE a $g=2.19$ a baixas temperaturas

Em alguns estados de redução nos quais se detecta o sinal Ni-C os espectros de RPE a baixa temperatura revelam a presença de outros sinais (Figura V.15).

A temperaturas inferiores a 15 K o espectro de RPE muda completamente, distinguindo-se um novo sinal com valores de g a 2,21 e 2,10 e componentes alargadas a valores de campo mais alto. Este sinal, que será designado por Sinal "2.21", apresenta características de relaxação electrónica rápida, sendo observado apenas a baixas temperaturas e a potências de microondas elevadas.

Na figura V.16 mostra-se a dependência do sinal complexo a baixa temperatura com a potência da radiação de microondas. O sinal a $g="2,21"$ é apenas detectado a valores de potência elevada, enquanto o sinal Ni-C só é completamente visível a potências relativamente fracas.

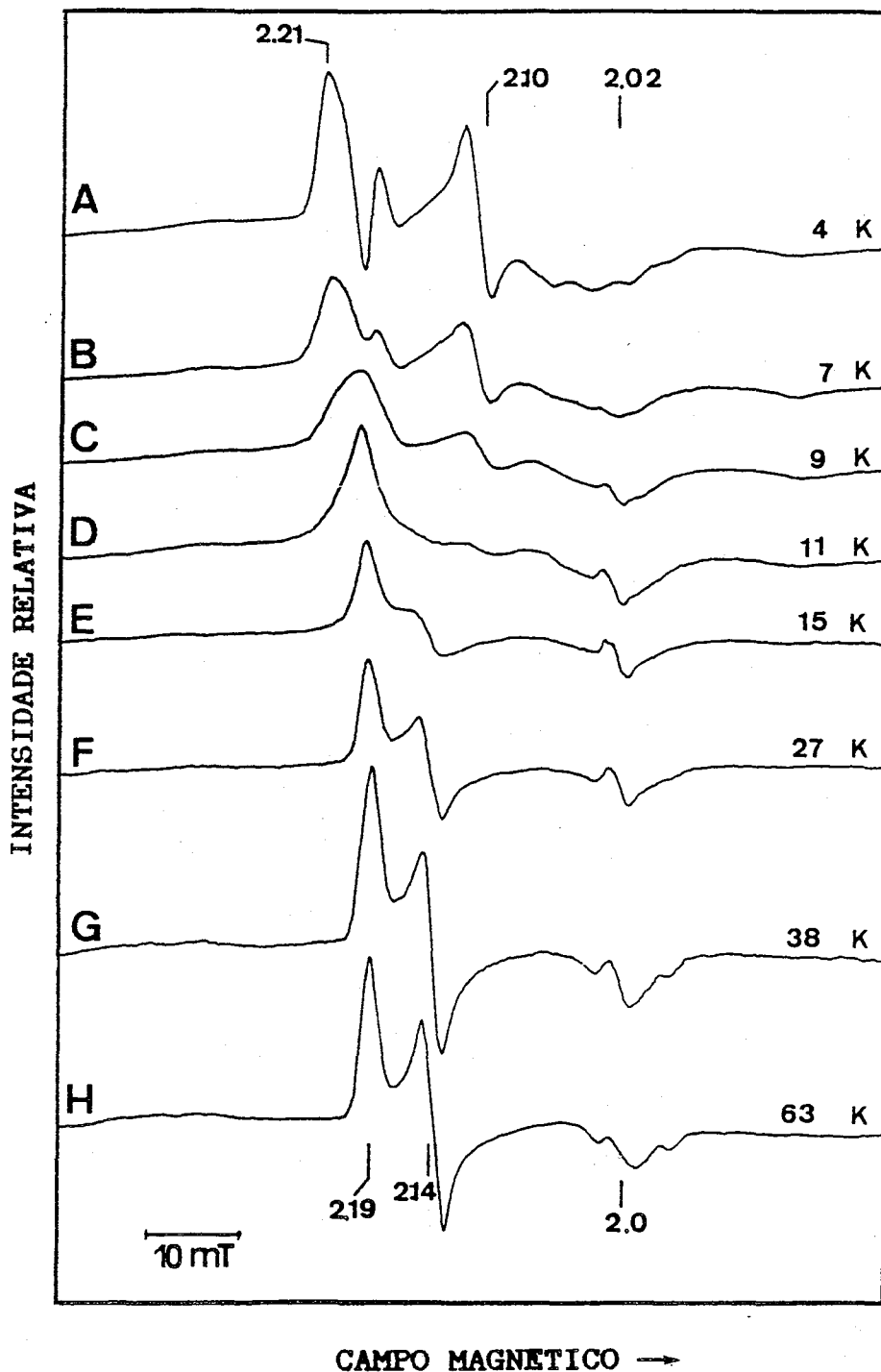
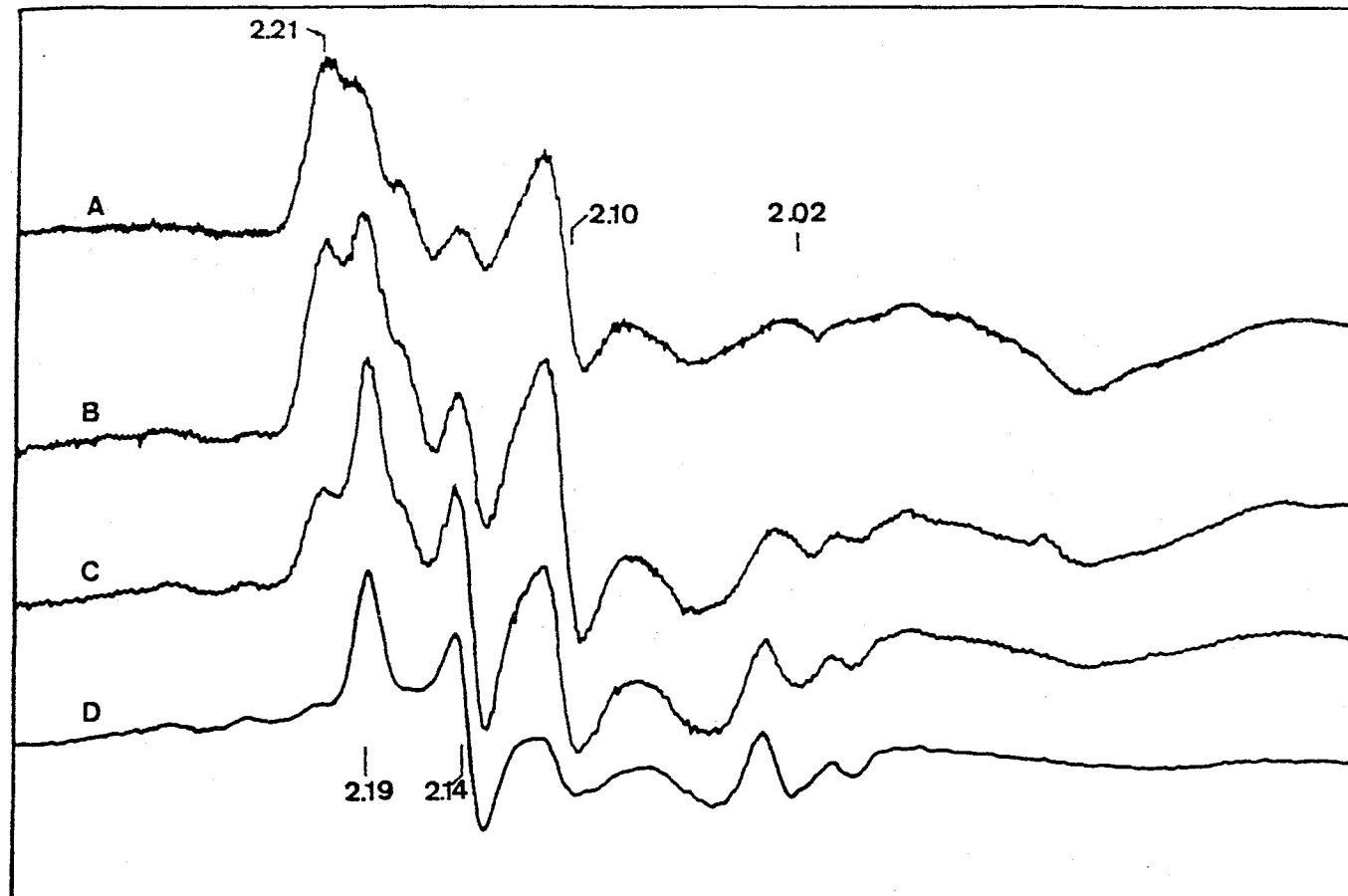


Figura V.15: Dependência com a temperatura dos sinais de RPE de um estado intermediário de redução da hidrogenase de *D. gigas*, enriquecida em ^{61}Ni , sob hidrogênio.

Temperatura e ganho: A-4 K, $3,2 \times 10^4$; B-7 K, 5×10^4 ; C-9 K, $6,3 \times 10^4$; D-11 K, 8×10^4 ; E-15 K, $6,3 \times 10^4$; F-27 K, 10×10^4 ; G-38 K, 2×10^5 ; H-63 K, 2×10^5
 Amplitude de modulação: 0,4 mT, excepto H-1mT
 Potência de microondas: 2 mW, excepto H -5 mW.



CAMPO MAGNETICO →

Figura V.16: Variação com a potência de microondas dos sinais a $g=2,21$ e a $g=2,19$ de uma amostra da hidrogenase de *D.gigas* reduzida sob H_2

Modulação: 1 mT; Temperatura: 10 K; Frequência: 9,52 GHz

Ganho e Potência: A-104 mW, $2,5 \times 10^4$; B-2 mW, 4×10^4 ;

C- 1,2 mW, $2,5 \times 10^4$; D- 200 μ W, $2,5 \times 10^4$

O sinal a $g=2,21$ foi igualmente obtido em amostras de hidrogenase enriquecida em ^{61}Ni (Figura V.17). No entanto, as larguras de linha são praticamente iguais em amostras em abundância natural ou enriquecidas em ^{61}Ni , notando-se apenas um pequeno alargamento a $g=2,21$ que pode resultar da contribuição do sinal a $g=2,19$. Esta observação sugere que o sinal pode ser devido a outra espécie paramagnética. As suas propriedades de relaxação (relaxação muito rápida) e a sua forma (o número de linhas detectado não permite atribuir o sinal a uma espécie simples com $S=1/2$), permitem por a hipótese de o sinal ser devido a centros $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ (com $S=1/2$, uma vez que os valores de g

deste sinal são todos perto de 2) em interacção magnética com outro paramagneto.

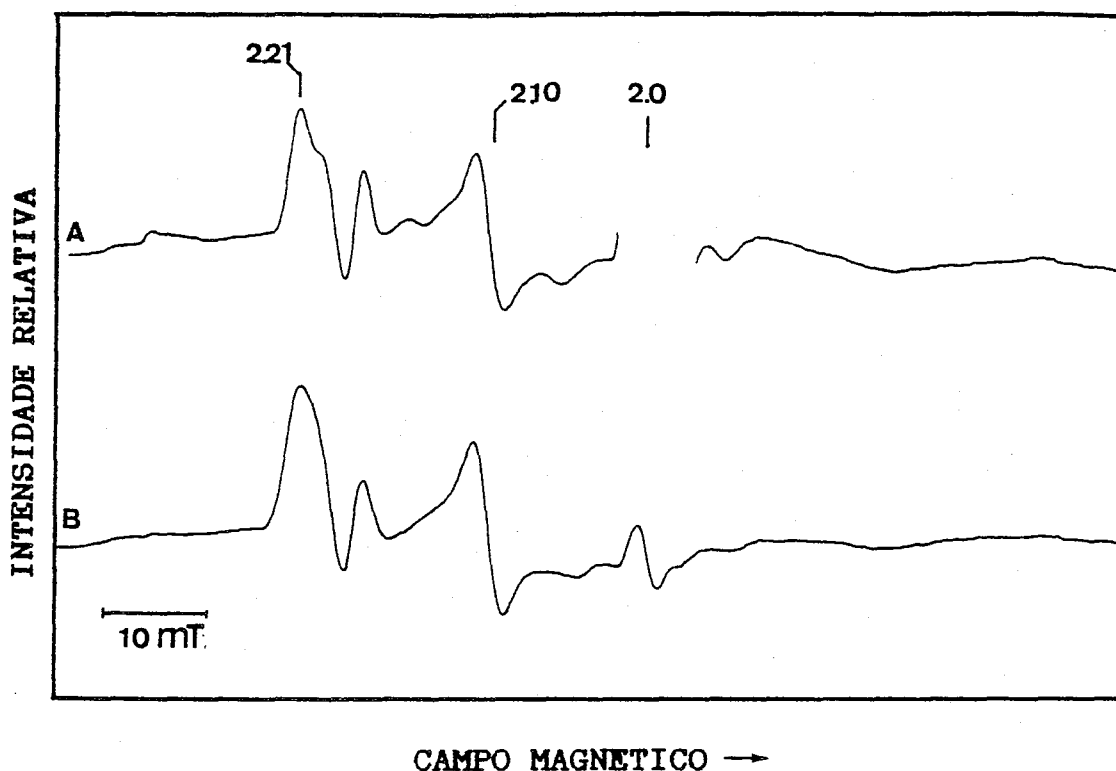


Figura V.17 - Sinal a $g=2,21$ obtido para a hidrogenase de *D.gigas* reduzida sob hidrogênio
 A-Abundância natural de ^{61}Ni
 B-Enriquecida em ^{61}Ni
 Temperatura: 4,2 K; Potência: 2 mW
 Amplitude de modulação : 1 mT
 Frequência: 9,41 GHz

V.4.4-Centros Fe/S

V.4.4.1-Estudos de Ressonância Paramagnética Electrónica

O sinal isotrópico do centro $[\text{3Fe-xS}]_{\text{ox}}$ presente no estado nativo da enzima desaparece nos primeiros passos da incubação com H_2 , o que sugere que ocorre a sua redução. A sequência de redução dos sinais isotrópico e Ni-A não parece ser idêntica quando é efectuada sob hidrogênio, o substrato natural, ou sob ditionito de sódio, um redutor químico. Na figura V.18 mostram-se

espectros de RPE de amostras reduzidas em ambas as condições, a pH=7,6.

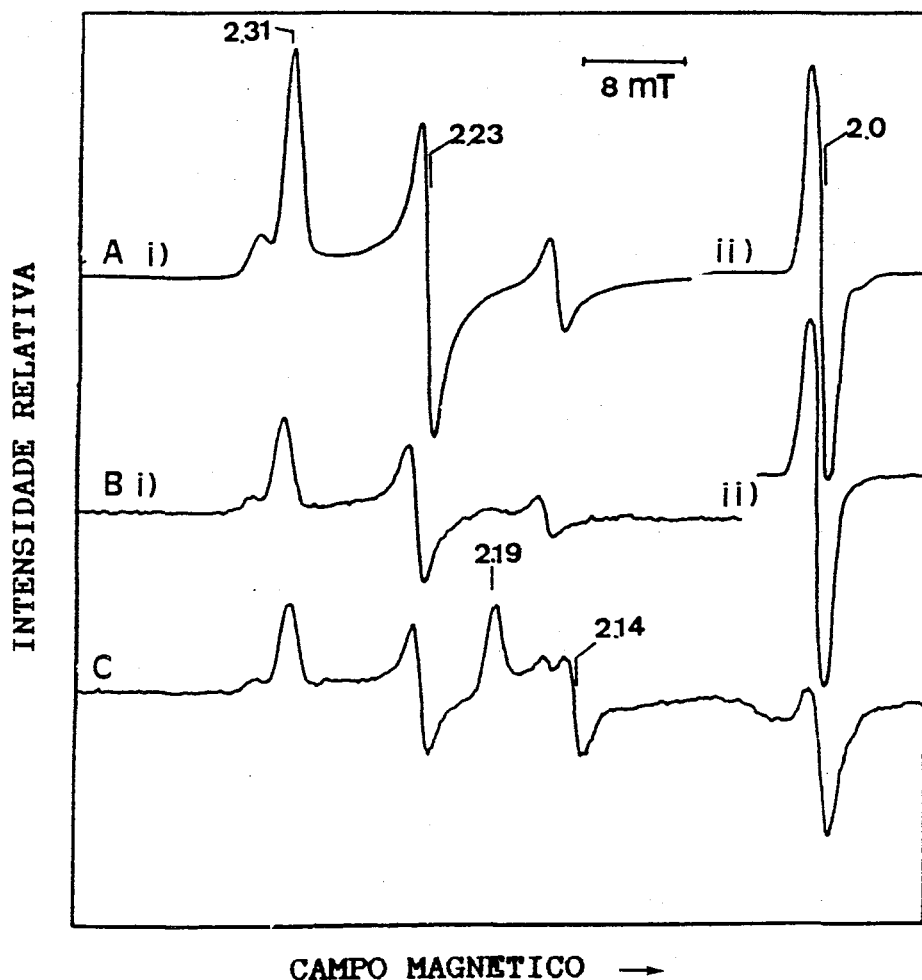


Figura V.18- Sinais de RPE de estados intermediários de redução da hidrogenase de *D. gigas* obtidos sob H_2 (B) ou com ditionito de sódio (C). (A)-Enzima nativa Temperatura: 11 K; Potência: 30 W; Modulação: 1 mT; Ganho: A)-i) 8×10^3 , ii) 50; B)-i) $1,6 \times 10^4$, ii) $1,25 \times 10^3$ C) $1,6 \times 10^4$

Verifica-se que quando a redução se dá sob ditionito ocorre uma redução preferencial do sinal isotrópico o que, como se verá adiante, está de acordo com os valores de potencial redox para a redução dos sinais isotrópico ($E'_O = -70$ mV) e a $g=2,31$ ($E'_O = -220$ mV, a pH=8,5). Na presença do substrato natural ocorre uma

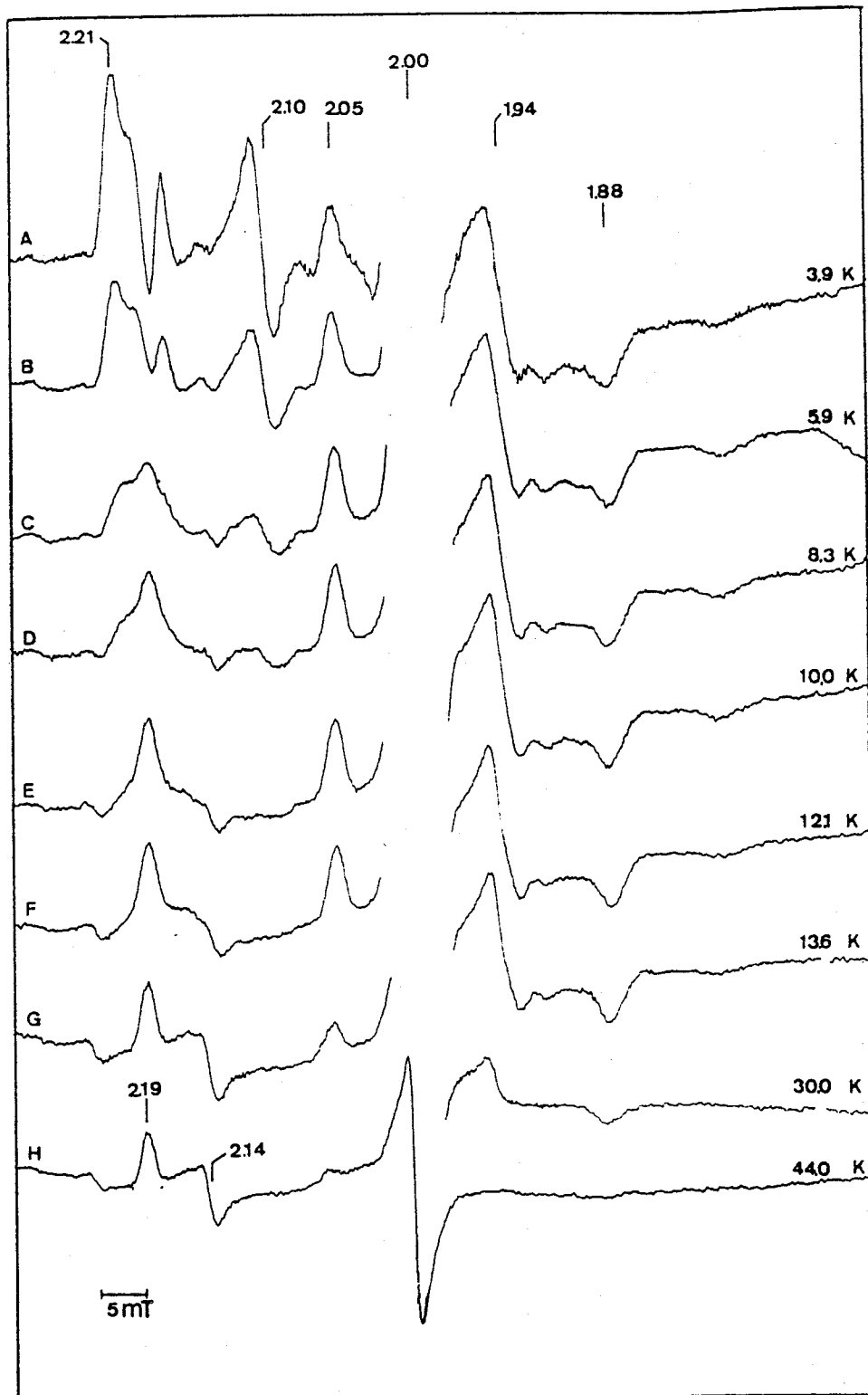
redução quase simultânea de ambos os sinais. Este resultado foi obtido com diversas amostras sob H_2 , nas quais se observa uma diminuição da intensidade do sinal a $g=2,31$ da ordem dos 40% a 80% e do sinal isotrópico da ordem dos 60% a 94%. Usando a equação de Nernst, estes resultados corresponderiam a uma diferença de potenciais redox para ambos os processos de redução de cerca de 20 a 25 mV, em desacordo com o valor obtido por titulação redox (entre 80 e 90 mV a $pH=7,6$).

Ao fim de tempos relativamente longos de redução com hidrogénio ou por redução com quantidades subestequiométricas de ditionito, para além do sinal a $g=2,21$ detecta-se a baixas temperaturas um sinal rômboico com valores de g a 2,05, 1,94 e 1,88 típico de centros $[4Fe-4S]^{1+}$ e que, por quantificação, corresponde a cerca de 0,1 spin/mol (Figura V.19 A-E).

As propriedades de relaxação dos sinais a 2,19 e 2,21, no que se refere à dependência com a temperatura destes sinais, não são afectadas pelo aparecimento deste centro Fe/S reduzido. Este sinal é detectável até cerca de 35 K, alargando-se totalmente a temperaturas superiores.

Nos estados mais reduzidos por adição de excesso de ditionito de sódio os sinais a $g=2,21$ e 2,19 desaparecem e, a baixa temperatura, desenvolve-se um sinal complexo, correspondendo a dois centros $[4Fe-4S]^{1+}$, e integrando até 0,5 spin/mol. Observam-se sinais aos valores de g de 2,10, 2,05, 1,94, 1,90 e 1,84 (Figuras V.20 e V.21), para além de componentes não resolvidas em torno de $g=1,94$ e a valores de campo magnético mais elevado.

INTENSIDADE RELATIVA



CAMPO MAGNETICO →

Figura V.19: Sinais de RPE da hidrogenase de *D. gigas* reduzida com quantidades subestequiométricas de ditionito de sódio
 Amplitude de modulação : 1 mT; Frequência : 9,41 GHz
 Potência de microondas: 2 mW
 Temperatura: A-3,9 K; B-5,9 K; C-8,3 K; D-10 K;
 E- 12,1 K; F-13,6 K; G-30 K; H-46 K

A forma complexa do espectro não pode ser explicada pela simples sobreposição de dois sinais rômnicos de centros daquele tipo, pois para além das linhas a $g=2,05$ e $g=1,94$, são detectáveis linhas a campo alto num número superior ao que seria de esperar. Assim, o espectro observado sugere uma interacção magnética fraca entre aqueles centros.

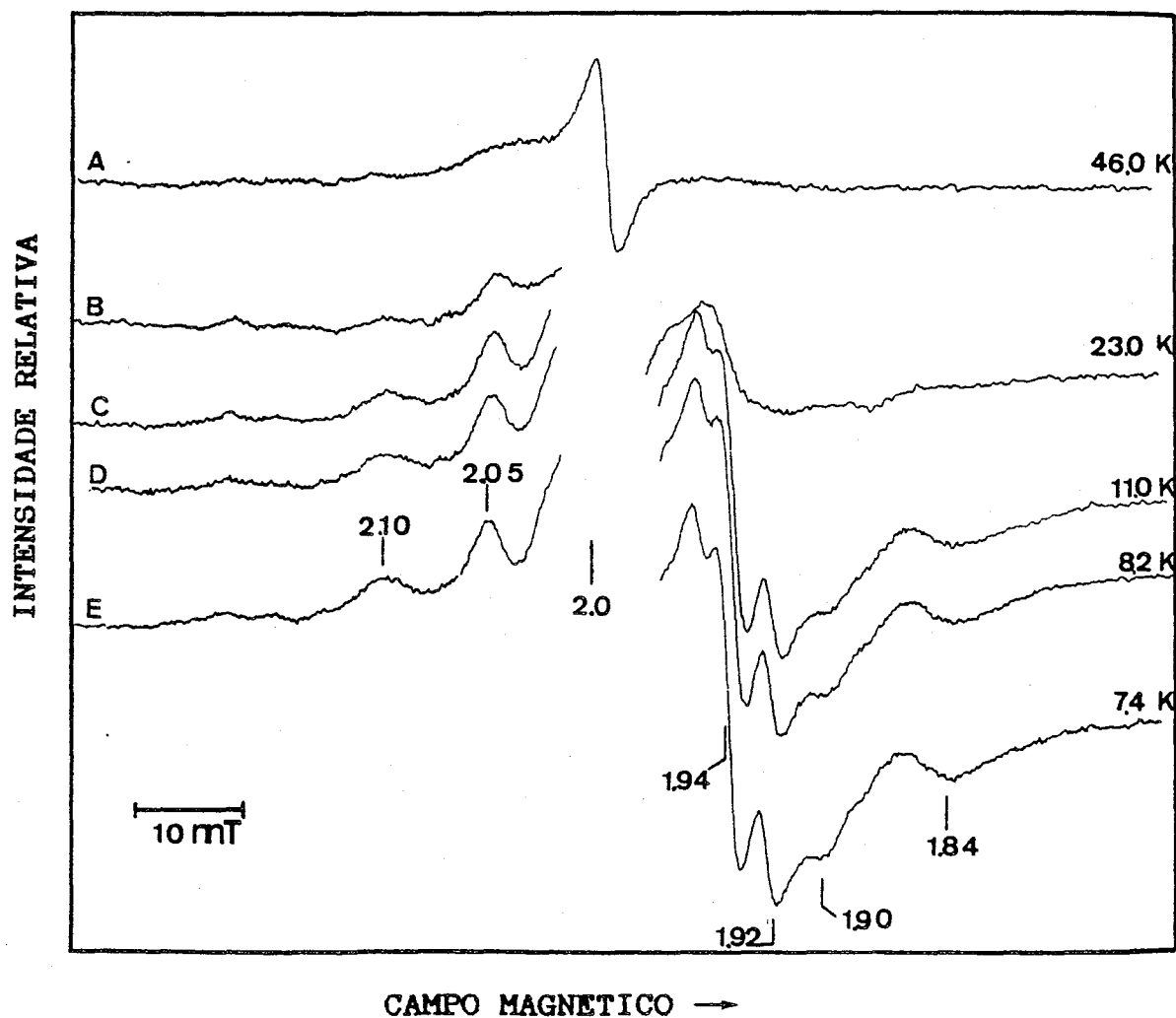


Figura V.20: Sinais de RPE da hidrogenase de *D. gigas* reduzida com excesso de ditionito de sódio
 Temperatura: A-46 K; B-23 K; C-11 K; D-8,2 K
 E-7,4 K. Ganho : 1×10^5 . Outras condições como na Fig.V.18

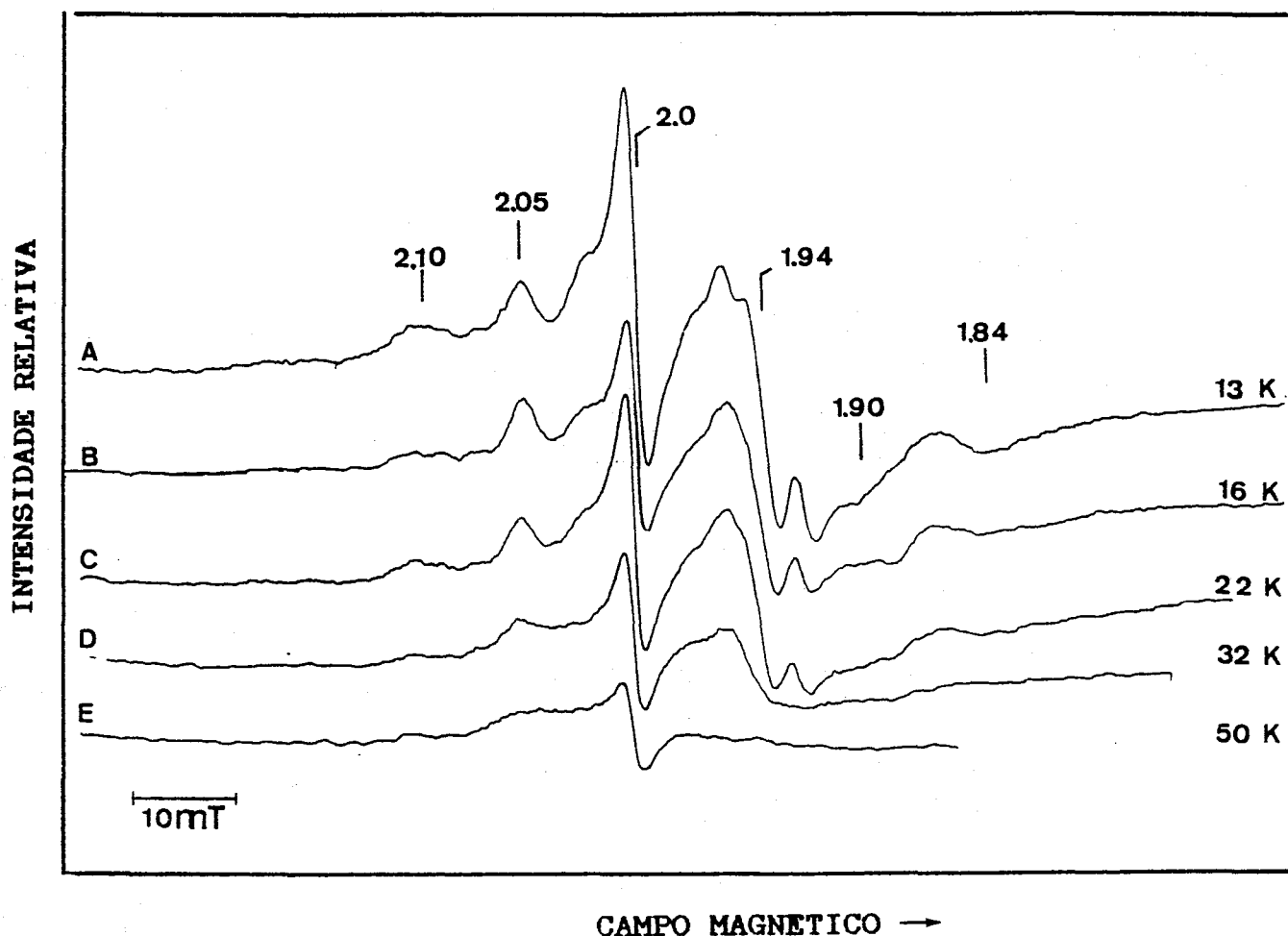


Figura V.21: Sinais de RPE da hidrogenase de *D. gigas* reduzida com excesso de ditionito de sódio, ao fim de um tempo de redução mais longo
 Temperatura: A-13 K; B-16 K; C-22 K; D-32 K; E-50 K
 Ganho: 1×10^5 . Outras condições como na Fig.V.18

Na figura V.22 são apresentados diversos espectros de RPE da hidrogenase de *D. gigas* reduzida ao longo de diferentes tempos de incubação sob hidrogénio ou após ciclos de redução/oxidação anaeróbica/redução. Os sinais são idênticos aos obtidos por redução com ditionito e permitem detectar uma componente a $g \approx 2,03$, não observável naquelas condições. Por comparação com os espectros a 8 e 12 K (Figura V.22 A e C) verifica-se que o sinal a

2,05 tem relaxação mais lenta , sendo mais facilmente observável a temperaturas superiores a 7 K.

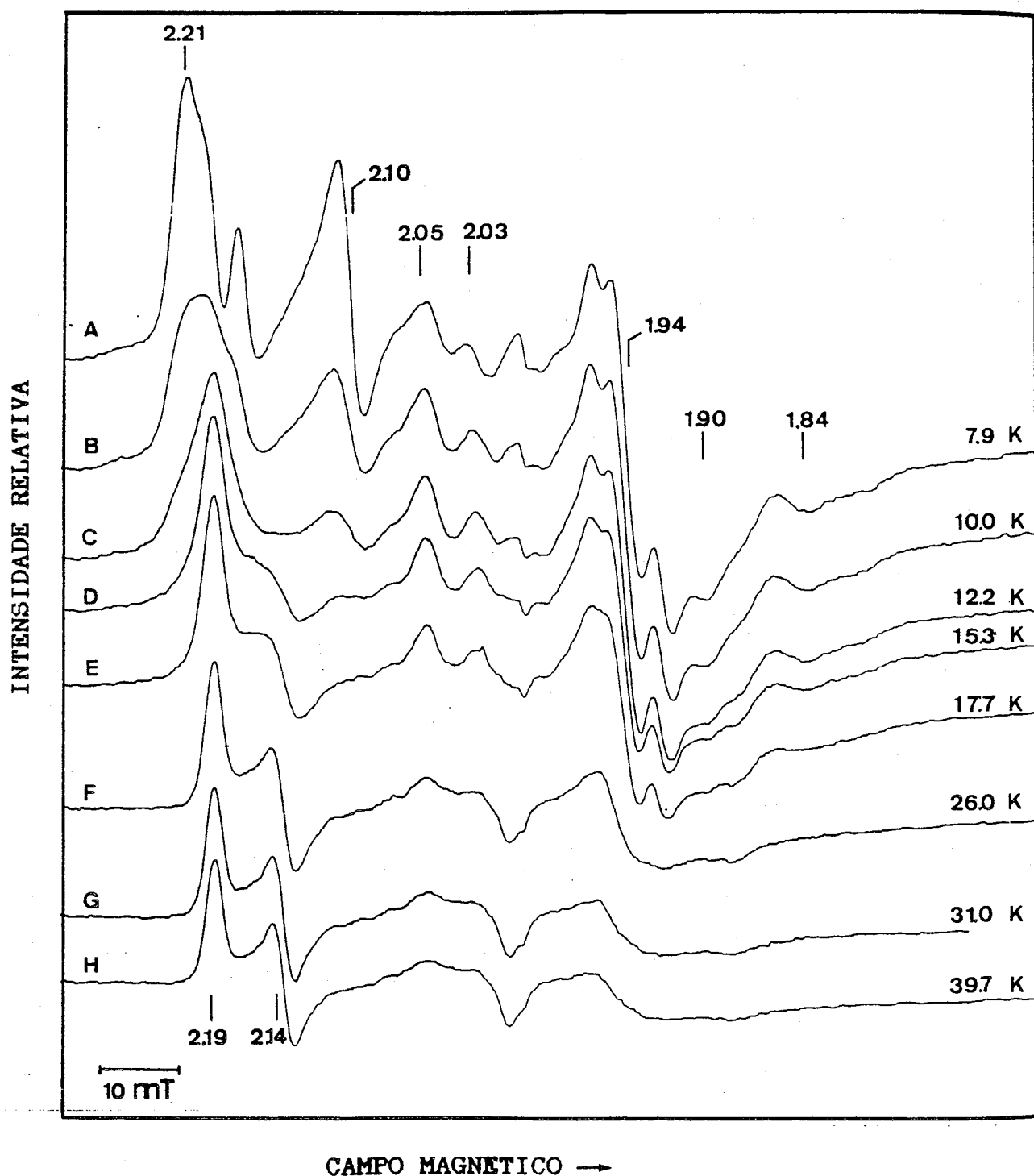


Figura V.22: Sinais de RPE da hidrogenase de *D. gigas* reduzida sob H_2
 Temperatura: A-7,9 K; B-10 K; C-12,2 K; D-15,3 K; E-17,7 K; F-26 K; G-31 K; H-39,7 K. Ganho: 1×10^5 . Outras condições como na Fig.V.18

É de referir, também, que para estes centros reduzidos não têm sido observados sinais de RPE na maioria das preparações da hidrogenase de *D.gigas*: em geral, os estados mais reduzidos que foram obtidos apresentam apenas sinais a $g=2,21$, o que sugere novamente um acoplamento entre os centros $[4Fe-4S]^{1+}$, sendo o baixo valor da integração também compatível com esta hipótese.

Em outras amostras, detecta-se na região entre $g=2,1$ e $1,8$ um sinal bastante alargado, quase sem estrutura resolvida, que poderá resultar deste sistema de acoplamento (Figura V.23).

Em diversas ferredoxinas contendo dois centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$, como por exemplo as ferredoxinas de *C.pasteurianum*, *C.tartarivorum* e *M.lactilyticus* (12), têm sido observados na forma totalmente reduzida sinais de RPE complexos, com valores de g dependentes da frequência da radiação de microondas, que foram explicados como resultando de acoplamento magnético entre os dois centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ reduzidos.

Como foi mencionado no Capítulo III, recentemente detectaram-se estados de spin superiores a $S=1/2$ para centros $[4Fe-4S]^{1+}$, que podem levar à não detecção de sinais de RPE para estes centros (13,14). Assim, é necessário um estudo mais detalhado da estrutura electrónica e magnética dos centros $[4Fe-4S]^{1+}$ da hidrogenase de *D.gigas*, para explicar estas observações.

Na maioria destes espectros de RPE observa-se ainda um sinal isotrópico a $g=2,00$, de intensidade variável, mas particularmente intenso em estados intermédios de redução. Embora possa, em parte, ter origem em produtos de redução do ditionito, a sua observação em amostras reduzidas apenas com hidrogénio

indica que este sinal pode ter outra origem, ainda não identificada.

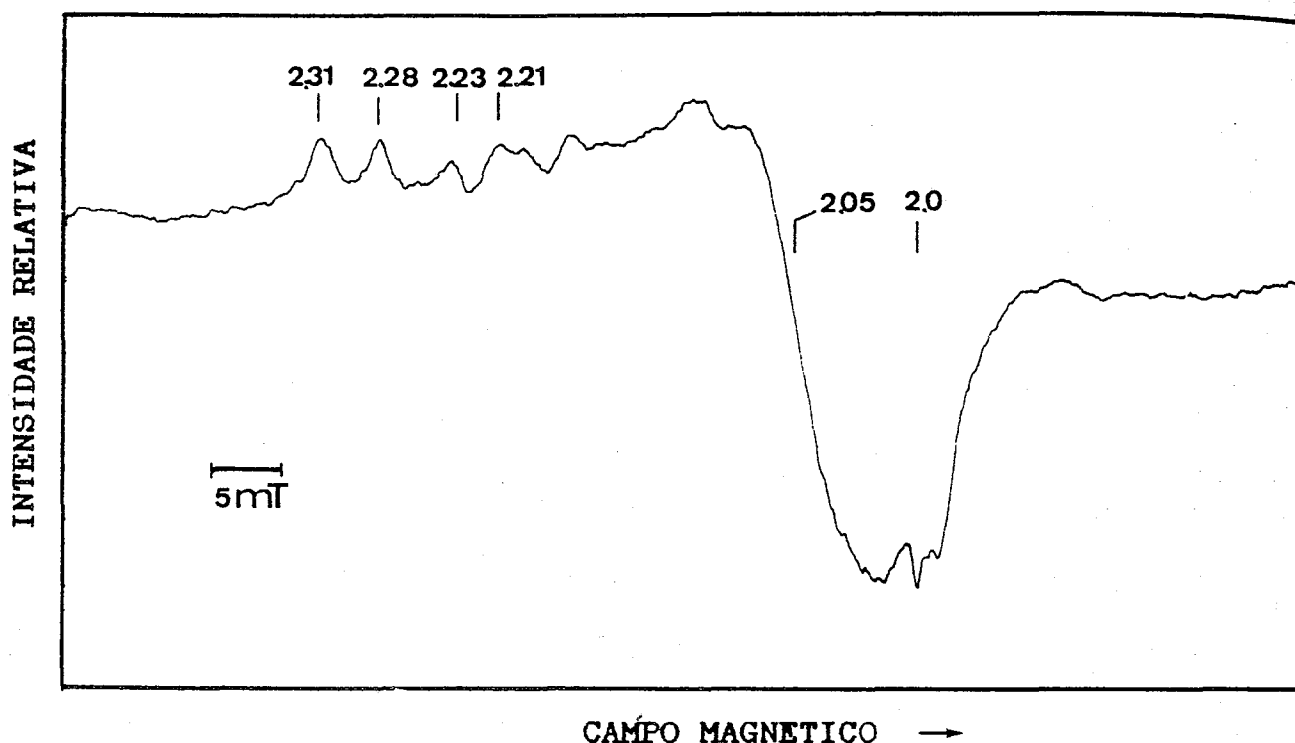


Figura V.23 : Espectro de RPE da hidrogenase de *D.gigas* reduzida sob hidrogênio
Temperatura: 4 K; Modulação: 1 mT
Potência: 2 mw; Frequência: 9,41 GHz

IV.4.4.2-Espectroscopia de Mössbauer

Prepararam-se diversas amostras da hidrogenase de *D.gigas*, enriquecida em ^{57}Fe , a diferentes potenciais redox, obtidos por redução química com ditionito de sódio (-80 mV e -270 mV) ou sob hidrogênio (-400 mV), na presença de mediadores redox. Foram traçados os espectros de Mössbauer e de RPE destas amostras, o que permitiu observar para o mesmo estado de redução todos os centros ferro-enzima e os sinais de níquel. Este trabalho foi

realizado em colaboração com o Prof. B.H.Huynh (9), sendo aqui apresentado devido à importância dos resultados obtidos, determinantes para a interpretação do trabalho apresentado neste capítulo.

-Centro [3Fe-xS]-

O espectro de RPE da amostra a -80 mV indicou que a intensidade do sinal isotrópico a $g=2,02$ decresceu para valores inferiores a 10% da intensidade inicial, enquanto o sinal rômbico de níquel a $g=2,31$ se mantém essencialmente com a mesma intensidade. Na figura V.24 mostra-se o espectro de Mössbauer desta amostra, na ausência de campo aplicado (Figura V.24-A) e na presença de um campo de 0,5 mT aplicado paralelamente à radiação γ (Figura V.24-B).

Na primeira situação observam-se apenas dobletos de quadrupolo, enquanto na presença de um campo aplicado fraco nota-se um espectro magnético alargado, particularmente nitido nas regiões entre -2 e -1 mm/s e entre +2 e +4 mm/s. Fazendo o espectro de diferença, a contribuição diamagnética dos centros $[4Fe-4S]^{2+}$ é cancelada, observando-se então dois dobletos de quadrupolo com uma razão de intensidades de 2:1 (Figura V.24-C). O desvio isomérico médio para os dobletos de quadrupolo do centro $[3Fe-xS]$ da hidrogenase é, novamente, superior ao da Fd II de *D.gigas* (Tabela V.8). O facto destes dobletos serem alargados por efeito de um campo magnético fraco e de serem observados na ausência de campo aplicado sugere que o centro de três ferros está magneticamente isolado de outros centros paramagnéticos e, em particular, como se observa do espectro de RPE que o níquel se mantém para-

magnético, pode concluir-se que não há interacção de spin entre o centro $[3\text{Fe-xS}]_{\text{red}}$ e o centro de níquel oxidado.

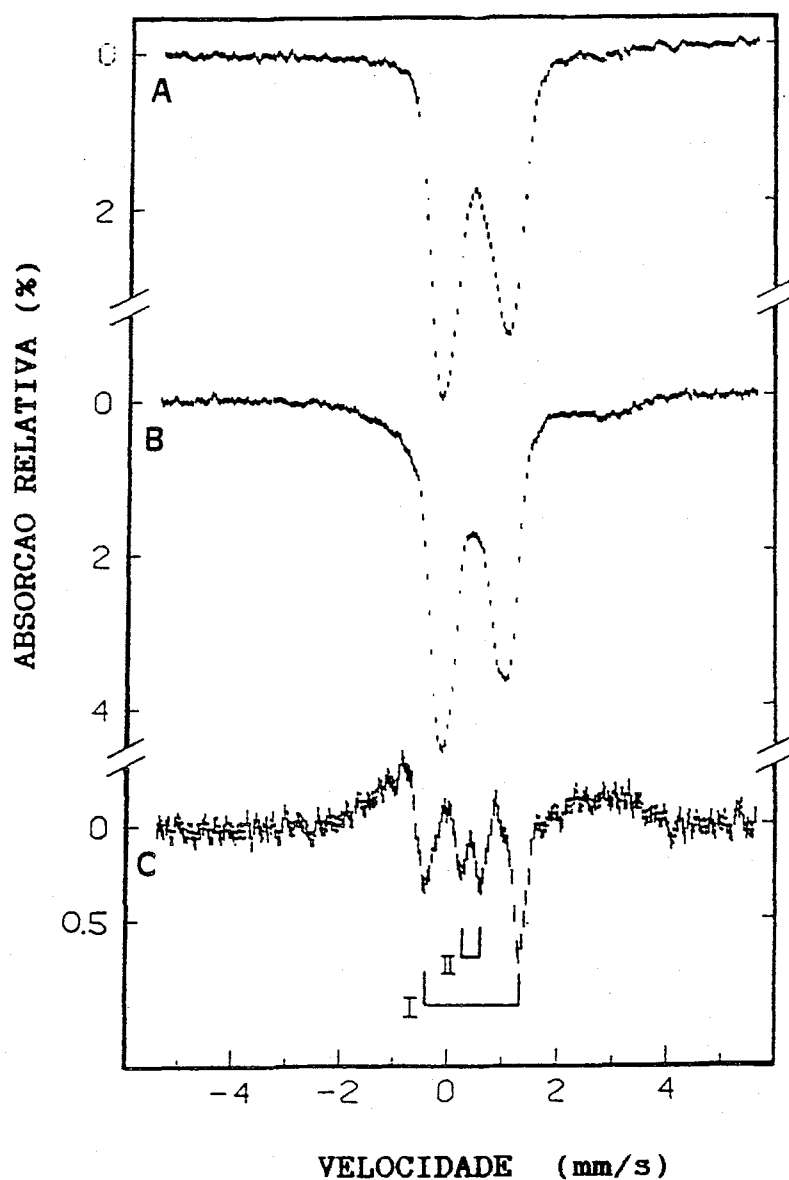


Figura V.24: Espectro de Mössbauer da hidrogenase de *D. gigas* a -80 mV, na ausência de campo magnético (A) e na presença de um campo de 50 mT aplicado paralelamente à radiação γ (B). O espectro C é o espectro de diferença de A e B. Temperatura: 4,2 K (9)

TABELA V.8: Parâmetros de Mössbauer para os centros [3Fe-xS]_{red} da hidrogenase e da Fd II de *D.gigas* (5,6,9)

Enzima		ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)
Fd II	doblete I	1,47	0,46
	doblete II	0,47	0,30
Hidrogenase	doblete I	1,73	0,44
	doblete II	0,30	0,42

Cammack *et al* (17) verificaram que em amostras da hidrogenase de *D.gigas* a +270 mV e -93 mV, correspondendo a estados da enzima nos quais o centro [3Fe-xS] se encontra, respectivamente, completamente oxidado e 95% reduzido, as propriedades de relaxação do Sinal Ni-A, medidas por determinação de $P_{1/2}$, não se alteram. Este facto indica a ausência de interacção magnética entre o centro de níquel e o centro [3Fe-xS] reduzido ou oxidado, confirmando os resultados obtidos por espectroscopia de Mössbauer.

Os sinais dos centros [3Fe-xS]_{red} e [4Fe-4S]_{ox} sobrepõem-se a campo magnético nulo ou fraco. Contudo, os campos magnéticos hiperfinos nos iões ferro do centro [3Fe-xS] são saturados por aplicação de um campo magnético de 1 T, obtendo-se um espectro com um desdobramento magnético total de cerca de 9 mm/s, enquanto os espectros dos centros [4Fe-4S] permanecem como doublets de quadrupolo. O espectro do centro [3Fe-xS] nestas condições é claramente visível pelos picos a -4 e -2 mm/s e a +4,7 mm/s (Figura V.25-A). Este padrão é praticamente idêntico ao da Fd II de *D.gigas* reduzida, pelo que o espectro foi analisado para um

sistema de $S=2$, podendo ser decomposto em duas subcomponentes com intensidades 2:1. O ajuste do espectro teórico foi efectuado com uma intensidade de 27%, sugerindo, por comparação com o sinal experimental, que a amostra contém um centro $[3\text{Fe-xS}]_{\text{red}}$ por molécula de enzima.

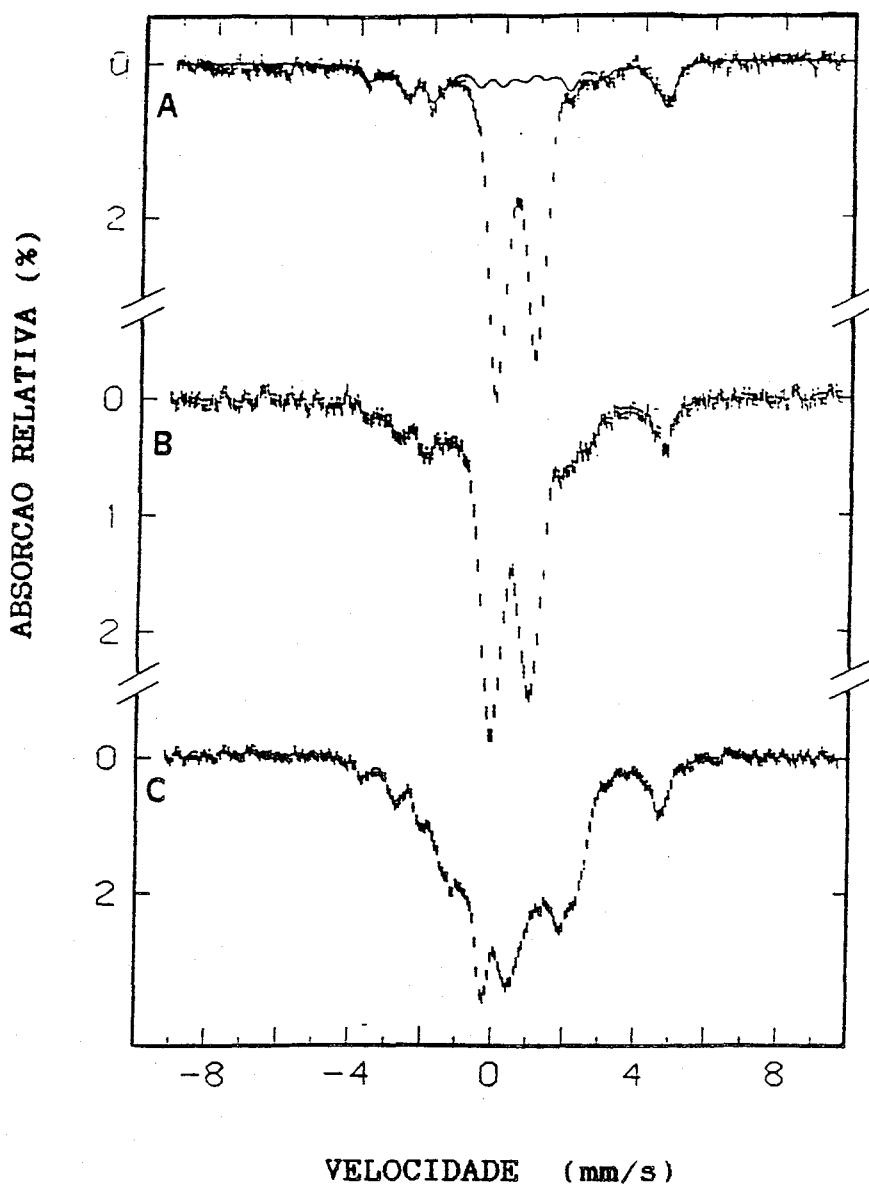


Figura V.25: Espectros de Mössbauer da hidrogenase de *D. gigas* reduzida sob H_2 a -80 mV (A), -270 mV (B) e -400 mV (C), obtidos a 4,2 K na presença de um campo magnético de 1 T aplicado paralelamente à radiação γ . A linha a cheio é a simulação teórica do espectro do centro $[3\text{Fe-xS}]$ reduzido (9).

Na figura V.25-B e C apresentam-se os espectros de Mössbauer de amostras a -270 e -400 mV, respectivamente. Para resolver os componentes subespectrais, os sinais foram obtidos a 4,2 K com um campo aplicado de 1 T. O espectro do centro $[3\text{Fe-xS}]$, quantificado pelo pico a +4 mm/s que se encontra isolado dos restantes sinais, mantém-se inalterado e com uma intensidade sempre cerca de 27 %. Este facto indica que este centro se mantém intacto nos estados reduzidos e cataliticamente activos da enzima, não sendo convertido em centros $[4\text{Fe-4S}]$.

-Centros $[4\text{Fe-4S}]$ -

A -400 mV todos os agregados de ferro da hidrogenase estão reduzidos. A contribuição dos centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ pode ser obtida por subtração do espectro do centro $[3\text{Fe-xS}]_{\text{red}}$ do espectro da figura V.25-B. Deste modo é possível estimar a percentagem de centros $[4\text{Fe-4S}]$ reduzidos ao longo da titulação redox. A -270 mV, cerca de 25% da absorção total do espectro deve-se a centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$, o que representa 0,7 centros $[4\text{Fe-4S}]_{\text{red}}$ por molécula de enzima. Por outro lado, o espectro de RPE desta amostra indica que o sinal de níquel a $g=2,31$, presente no estado nativo, sofreu uma diminuição de intensidade de cerca de 70 %, não se observando ainda qualquer outro sinal. Contudo, um centro $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ deveria ser visível em RPE, pois em geral apresenta um estado de spin com $S=1/2$. Uma possível explicação para a não observação do sinal de RPE típico a $g\sim 1,94$ é este centro estar magneticamente acoplado ao centro de níquel, pelo que o potencial de -220 mV obtido por titulação redox do sinal a $g=2,31$ seria, de facto, o potencial redox para a redução do centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$.

Os espectros de Mössbauer na ausência de campo aplicado são também magnéticos, o que indica a presença de espécies paramagnéticas. Assim, o acoplamento do centro $[4\text{Fe-4S}]$ com o centro de Ni(III) ($S=1/2$), não conduz a sistemas diamagnéticos com $S=0$, que originariam espectros de Mössbauer não magnéticos.

Estes dados de espectroscopia de Mössbauer são ainda preliminares, não permitindo explicar as características dos espectros de RPE dos centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ os quais, como já referido anteriormente, são silenciosos em RPE ou dão origem a espectros extremamente alargados. Por outro lado, o espectro de Mössbauer dos centros $[4\text{Fe-4S}]$ reduzidos é semelhante em todos os estados de redução da enzima, o que leva a supor que as suas características são idênticas em todos estes estados, ou seja, a sua vizinhança e o sistema de acoplamento magnético mantêm-se. Contudo, os dados obtidos para o centro de níquel sugerem mudanças de estado de oxidação e de coordenação neste centro, pelo que seria de esperar que estas transformações se reflectissem no espectro de Mössbauer dos centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$, o que aparentemente não se verifica.

E de referir ainda que os resultados de espectroscopia de Mössbauer não permitem excluir totalmente outra hipótese para explicar o desaparecimento do sinal de níquel a $g=2,31$ pelo processo redox a $E'_0 = -220$ mV: esta transformação poderia resultar de uma redução efectiva do centro de níquel (transição $\text{Ni(III)} / \text{Ni(II)}$), obtendo-se um estado silencioso em RPE, visto que em geral os compostos de Ni(II) octaédricos, com $S=1$, não são activos em RPE. O acoplamento magnético deste centro de níquel com um agregado $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ poderia conferir a este centro propriedades

magnéticas, que resultariam no espectro de Mössbauer observado (ver discussão adiante); por outro lado, como atrás foi mencionado, por vezes os centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ apresentam spin electrónico semi-inteiro $S > 1/2$, não dando origem aos sinais de RPE típicos a $g_m \sim 1,94$.

V.5-Ciclos de redução / oxidação da hidrogenase de *D.gigas* sob hidrogénio

Para uma análise mais detalhada dos intermediários obtidos por incubação sob hidrogénio foram realizados ciclos de redução / oxidação da hidrogenase em atmosfera anaeróbica sob hidrogénio ou azoto. Uma sequência típica envolveu a redução da enzima ao longo de tempos crescentes de incubação sob hidrogénio, passando por estados em que se observa o sinal a $g=2,19$, até se atingir um estado silencioso em RPE a 77 K, seguida de uma reoxidação anaeróbica lenta, sob azoto. Esta sequência foi repetida diversas vezes com as mesmas amostras, testando-se assim a reversibilidade dos processos envolvidos.

O citocromo c_3 tetrahémico tem sido indicado como o aceitante e doador de electrões fisiológico para a hidrogenase, pelo que foram realizadas experiências semelhantes na presença desta proteína de *D.gigas*, em misturas equimolares. Realizaram-se os seguintes tipos de ensaios:

- 1-Ciclo de redução/oxidação na ausência de citocromo c_3 .
- 2-Após a redução da hidrogenase com H_2 adicionou-se citocromo c_3 oxidado e reoxidou-se anaerobicamente a amostra sob azoto. Repetiu-se o ciclo de redução/oxidação. Esta experiência foi realizada também com hidrogenase enriquecida em ^{61}Ni .

3-Uma mistura equimolar de citocromo c_3 e hidrogenase oxidados foi reduzida sob hidrogénio e reoxidada sob azoto.

4-A uma amostra de hidrogenase oxidada adicionou-se citocromo c_3 reduzido sob hidrogénio na presença de traços de hidrogenase e efectuaram-se os ciclos de oxidação / redução anteriores.

O citocromo c_3 , no estado oxidado, apresenta um espectro de RPE que, na região de g_z , mostra diversos sinais sobrepostos devido aos quatro hemos não equivalentes ($g_z=3,3-2,8$) e em g_y apresenta um intenso pico de derivada a cerca de $g=2,28$. (Figura V.26). Embora a 77 K as linhas espectrais estejam já alargadas, são ainda detectáveis, pelo que para a observação dos sinais de RPE da hidrogenase foi necessário subtrair dos espectros a contribuição do sinal do citocromo c_3 .

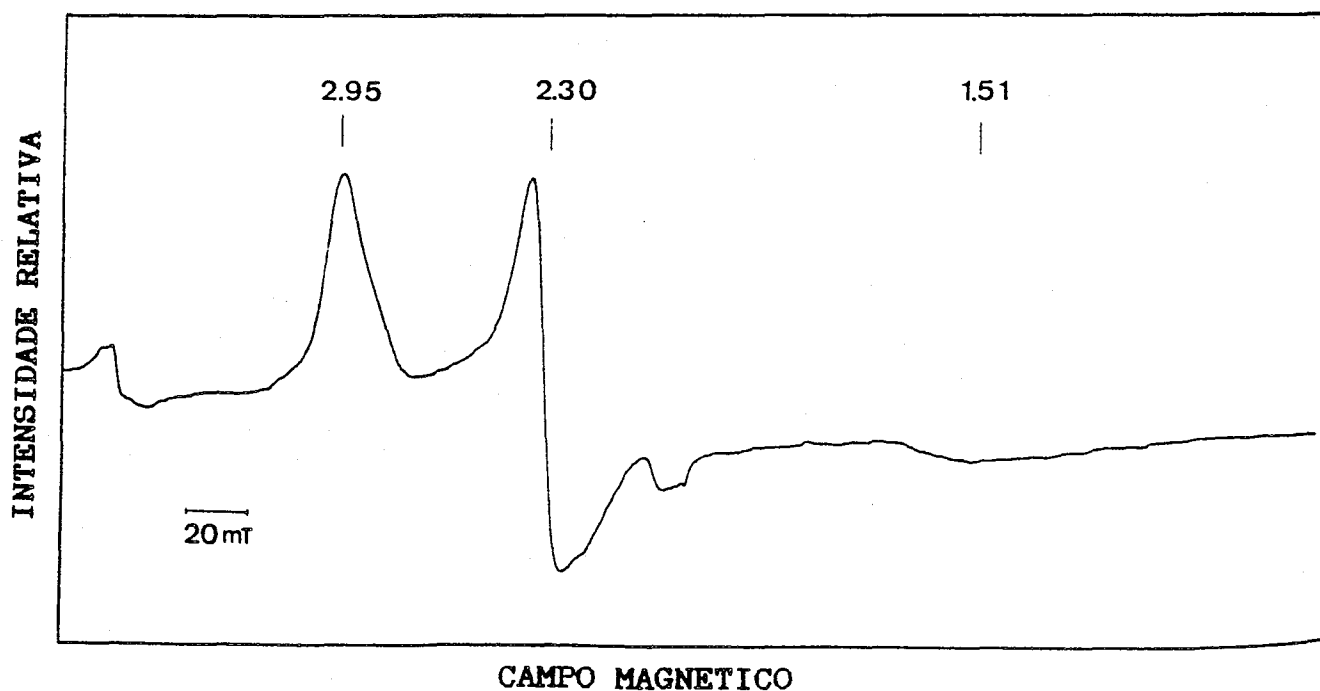


Figura V.26: Espectro de RPE do citocromo c_3 tetrahêmico de *D.gigas*.

Temperatura: 21 K; Potência de microondas: 6,3 mW
Modulação: 1 mT; Frequência: 9,41 GHz

Os resultados obtidos são semelhantes, independentemente do tipo de ciclo efectuado. Apresentam-se nas figuras V.27 e V.28 duas sequências típicas de espectros ao longo dos ciclos de redução/oxidação. Verifica-se que os processos são inteiramente reversíveis, isto é, consegue-se reproduzir a mesma sequência de sinais por redução seguida de oxidação e observou-se que a mesma amostra pode ser sujeita a sucessivos ciclos sem degradação da enzima (recupera-se a intensidade do sinal de RPE da amostra nativa).

O comportamento da hidrogenase na presença ou ausência de citocromo c_3 é idêntico mas, embora apenas de modo qualitativo, notou-se também que a presença deste citocromo aumenta consideravelmente a facilidade com que a enzima é reduzida e permite um melhor controlo dos processos de reoxidação. Assim, por reoxidação lenta (Figura V.27 - C-G), após o desaparecimento do sinal a $g=2,19$ e depois de se atingir um estado silencioso em RPE, observa-se que o sinal a $g=2,33$ é o primeiro a desenvolver-se, conseguindo-se mesmo obter estados em que o espectro de RPE apenas apresenta este sinal. Prosseguindo a reoxidação, dá-se então a formação do sinal presente no estado nativo, a $g=2,31$, que, progressivamente, substitui o sinal a $g=2,33$. Verificou-se ainda que após a reoxidação anaeróbica, uma nova redução da enzima sob hidrogénio, com formação do sinal a $g=2,19$, é bastante mais rápida, sugerindo que a enzima foi activada pelo ciclo de redução/ reoxidação anaeróbica.

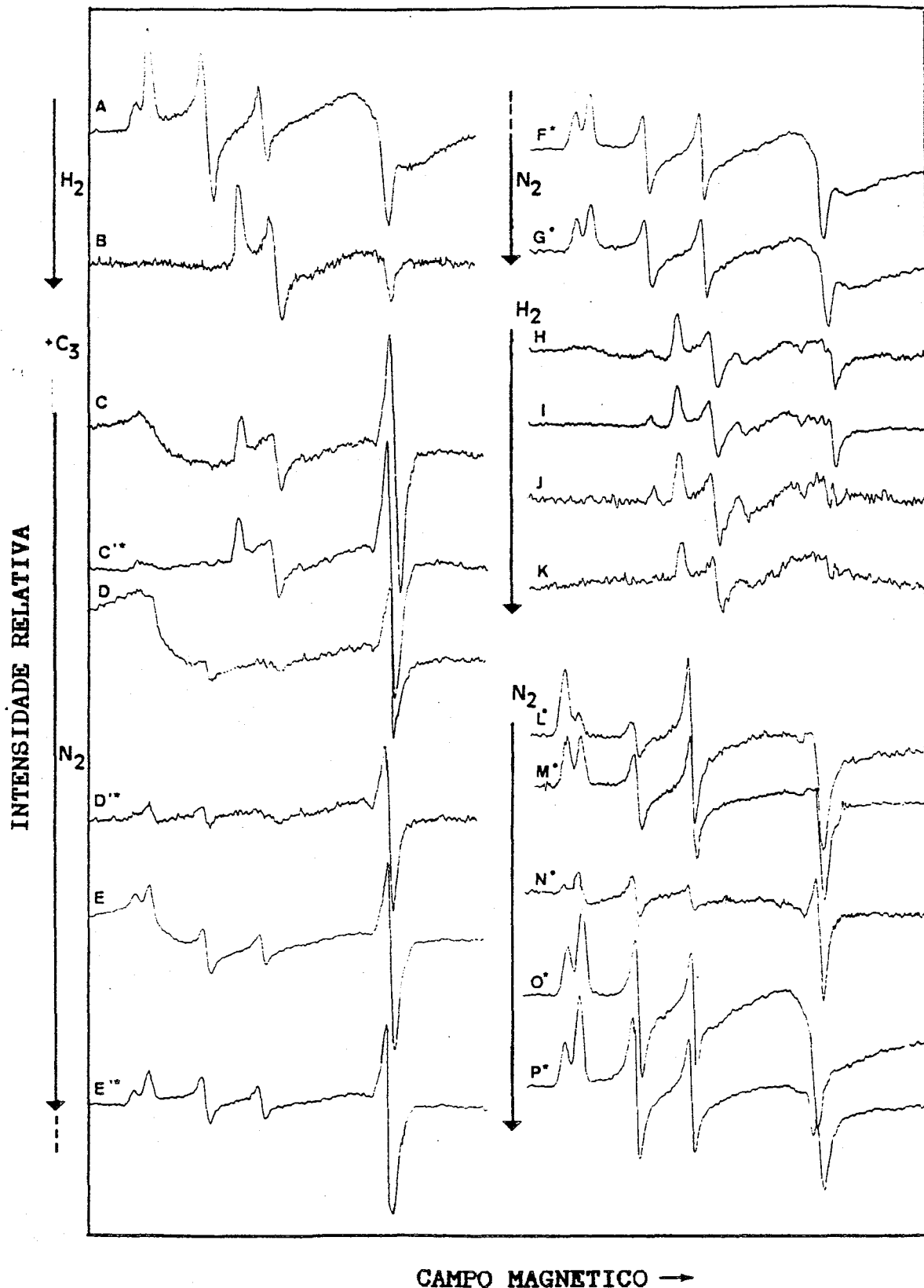


Figura V.27: Ciclo de redução/oxidação da hidrogenase de *D. gigas*

Ensaio: Ciclo 2 . Temperatura: 77 K

A- Enzima nativa; B-Enzima reduzida sob H_2 ; C-Adição de c_3
D-G: Reoxidação sob N_2 ; H-K: Redução sob H_2 ; L-P: Reoxidação sob N_2 . *-Espectro obtido após subtração da contribuição de c_3 . '-Espectros idênticos aos anteriores
Potência: 2 mW; Modulação : 1 mT; Frequência: 9,28 GHz
Ganho variável

INTENSIDADE RELATIVA

H₂

N₂

CAMPO MAGNETICO →

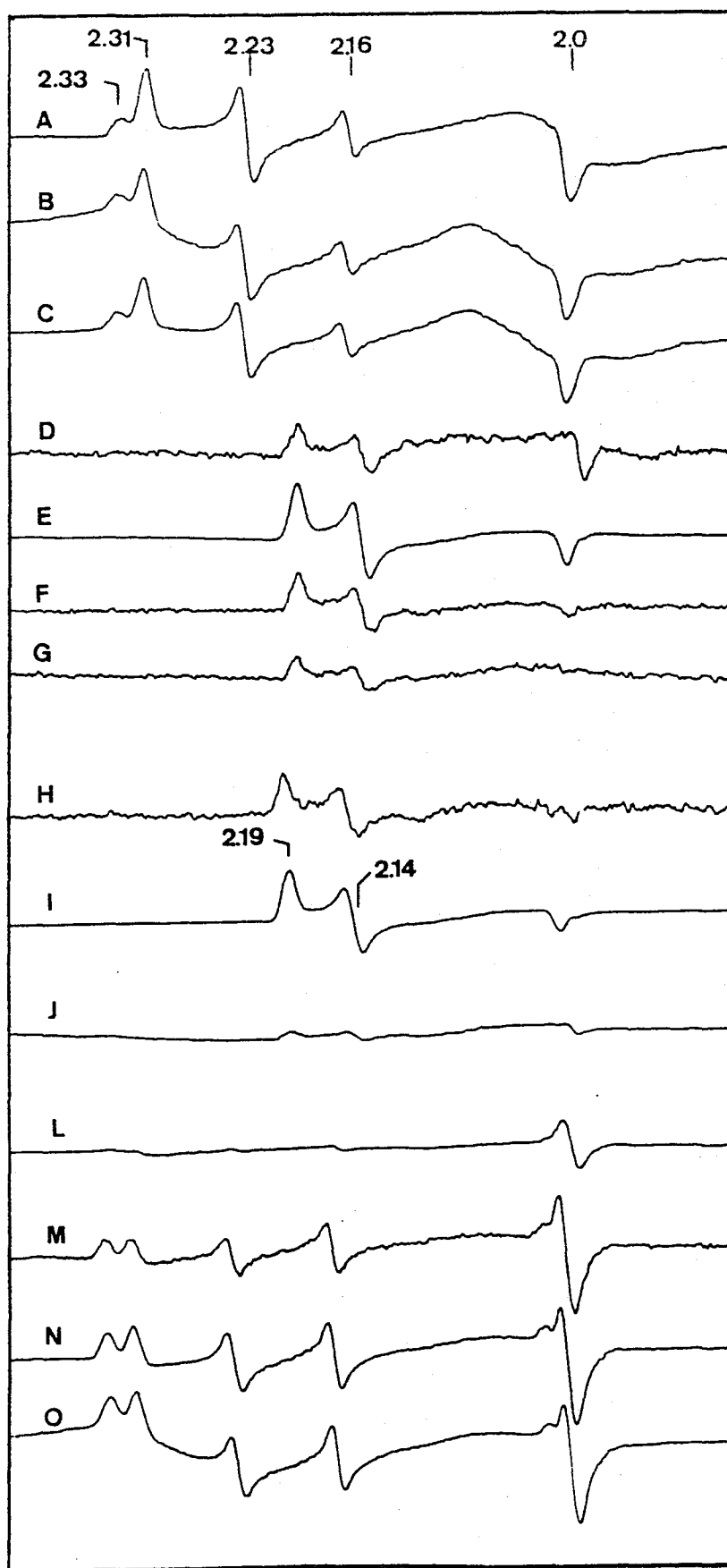


Figura V.28: Ciclo de redução/oxidação da hidrogenase de *D. gigas*

Ensaio: Ciclo 3 . Temperatura: 77 K

A- Enzima nativa; B- Complexo 1:1 c₃/Hase; C- B subtraído do espectro de c₃; D-G Redução sob H₂; H-O Reoxidação sob N₂. Contribuição de c₃ subtraída excepto em O. Outras condições como na Fig.V.26

As experiências na presença de citocromo c_3 permitiram também obter uma estimativa do valor de potencial redox ao qual se dá a formação do sinal a $g=2,19$: o aparecimento por redução ou o desaparecimento por reoxidação deste sinal é concomitante com o desaparecimento ou a formação do sinal de RPE do citocromo c_3 , o que sugere uma semelhança de potenciais redox, ou seja, a formação do sinal a $g=2,19$ está associado a processos de oxidação/redução com um potencial de cerca de -330 mV, a $pH=7,6$.

Nos estados mais reduzidos destes ciclos traçaram-se os espectros de RPE a baixa temperatura. Os sinais observados são semelhantes aos obtidos para as amostras de hidrogenase reduzida longo tempo sob hidrogênio, isto é, detectam-se os sinais a $g=2,21$ e sinais complexos de centros $[4Fe-4S]^{1+}$ (Figura V.29).

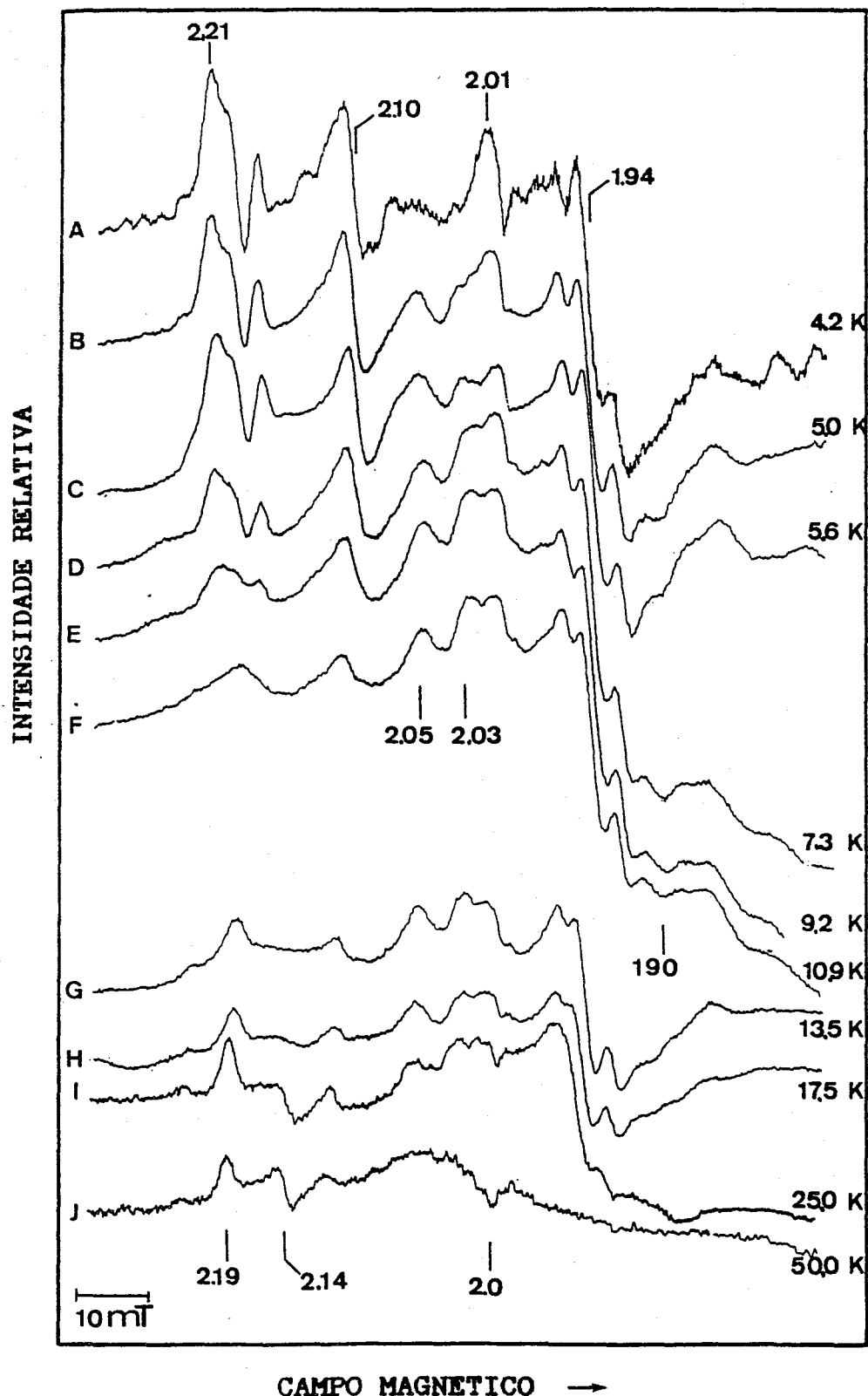


Figura V.29: Sinais de RPE a baixa temperatura de uma amostra de hidrogenase de *D. gigas* reduzida sob H_2 na presença de citocromo c_3 tetrahêmico de *D. gigas*. Temperatura: A-4,2 K; B-5 K; C-5,6 K; D-7,3 K; E-9,2 K; F-10,9 K; G-13,5 K; H-17,5 K; I-23 K; J-50 K. Ganho: $2,5 \times 10^4$, excepto I (10×10^4) e J ($1,25 \times 10^4$). Potência: 2 mW; Modulação: 1 mT; Frequência: 9,41 GHz.

V.6-Outros espécies paramagnéticas detectadas por RPE

Para além de todos os sinais de RPE referidos nas secções anteriores, têm sido detectados outros sinais ainda não completamente identificados.

V.6.1-Sinal de RPE a $g=12$

Em amostras de hidrogenase parcialmente reduzida, nas quais apenas o sinal isotrópico a $g=2,02$ desapareceu, detecta-se um sinal de RPE a baixa temperatura, a $g=12$ (Figura V.30). Este sinal nem sempre é visível nas amostras totalmente reduzidas. Hagen e colaboradores (15) detectaram um sinal semelhante na ferredoxina de *T.thermophilus* (que contém um centro $[3Fe-xS]$ e um centro $[4Fe-4S]^{2+/1+}$) reduzida. O sinal foi atribuído por estes autores a uma transição $m_s=4$ no centro $[3Fe-xS]$ reduzido ($S=2$).

Johnson *et al* (19) propuseram que o sinal de RPE a $g=12$ detectado na hidrogenase de *D.gigas* teria a mesma origem e que o facto de ele não ser observado nas amostras totalmente reduzidas resultaria de uma alteração conformacional no agregado $[3Fe-xS]_{red}$ ou de acoplamento magnético entre este centro e outro centro paramagnético na hidrogenase.

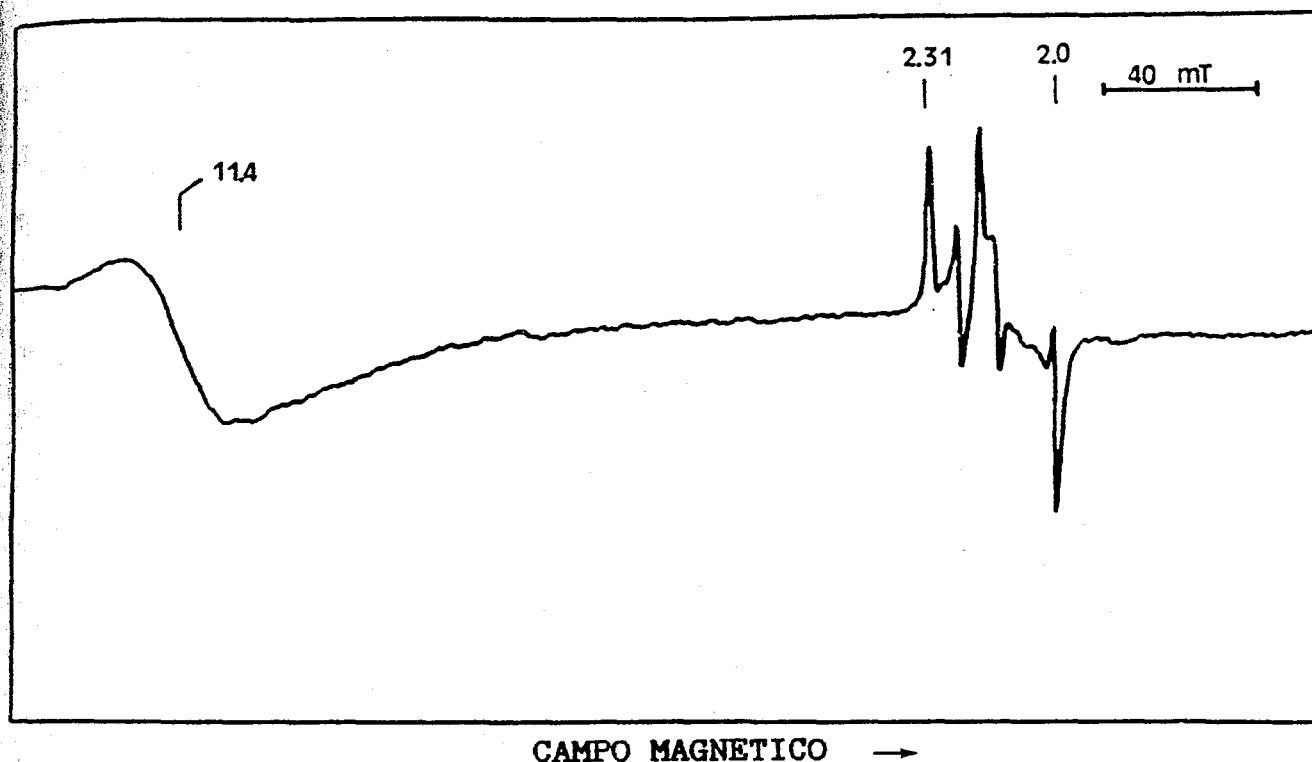


Figura V.30: Sinal de RPE a $g=12$ da hidrogenase de *D.gigas* parcialmente reduzida sob H_2
 Temperatura: 8 K; Frequência: 9,41 GHz;
 Modulação 1 mT; Potência: 2 mW

V.6.2-Sinal de RPE a $g=2.28$

Em algumas amostras da hidrogenase de *D.gigas* reduzida sob hidrogênio, em estados em que está presente o sinal a $g=2,19$ tem sido observado outro sinal rômboico com valores de g a 2,28 , 2,12 e 2,03 (Figura V.31).

Este sinal é particularmente nitido em amostras preparadas em misturas de etilenoglicol / água (1:1). A baixa temperatura, parece ocorrer um desdobramento de cerca de 1,2 mT a g_x , surgindo linhas aos valores de g de 2,29 e 2,27 e de perto de 2,4 mT a g_z , aparecendo linhas a $g=2,04$ e 2,02. Em g_y , devido à sobreposição da linha a $g=2,10$ do sinal a " $g=2,21$ " não foi possível medir o

valor deste desdobramento.

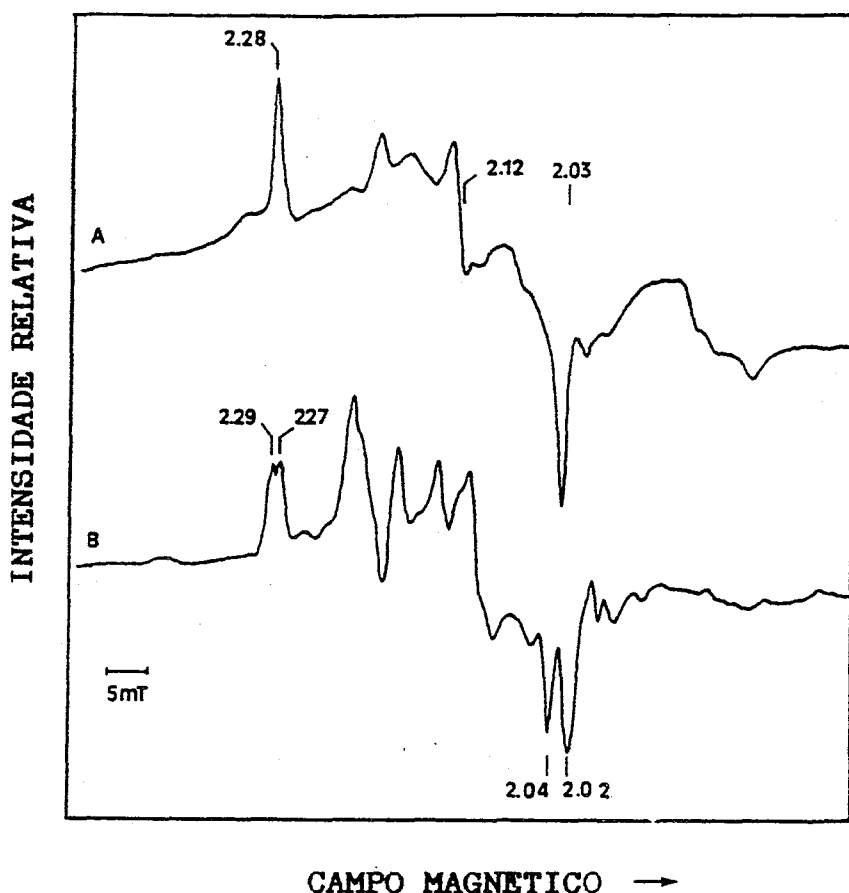


Figura V.31: Sinal de RPE a $g=2,28$ da hidrogenase de *D.gigas* parcialmente reduzida sob hidrogênio
Temperatura: A-11 K; B-4,2 K. Modulação : 1 mT
Potência: 2 mW (A), 0,63 mW (B); Frequência: 9,53 GHz

O sinal a $g=2,28$ tem valores de g semelhantes aos encontrados por Albracht et al (20) na hidrogenase de *Chromatium vinosum* após irradiação a 4 K com uma lâmpada de arco de Xenon, de amostras desta hidrogenase reduzidas sob hidrogênio, em estados onde o sinal a $g=2,19$ está presente. Foi também observado por Johnson et al (19) na hidrogenase de *D.gigas*, por irradiação de amostras desta enzima com o sinal a $g=2,19$. Albracht e colaboradores atribuíram este novo sinal à quebra de uma ligação Ni-H (complexo hidreto), hipoteticamente presente no centro correspondente ao sinal a $g=2,19$.

Os dados disponíveis não permitem ainda uma caracterização completa e uma identificação da origem deste sinal na hidrogenase de *D.gigas*. No entanto, é interessante referir que em diversos estados de redução das enzimas xantina oxidase e aldeído oxidase, (21,22) contendo um agregado $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ ($S=1/2$) e um centro com um ião Mo(V) ($S=1/2$), se observa um desdobramento de cerca de 2,0 mT do sinal de Mo(V) . Este desdobramento é observável apenas a temperaturas inferiores a 40 K e quando os centros de ferro e de molibdênio se encontram naquele estado de oxidação. A temperaturas superiores as linhas colapsam em linhas centrais, com valores de g médios dos medidos a baixa temperatura. Estas observações foram interpretadas pelos autores como resultando de um acoplamento magnético de permuta entre Mo(V) e um centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$; a temperaturas elevadas, a relaxação electrónica do centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ é rápida, pelo que não se detecta o desdobramento do sinal de Mo(V) . É possível que o desdobramento do sinal a 2,28 da hidrogenase resulte de acoplamento a um centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$, o que estaria de acordo, aliás, com as observações de espectroscopia de Mössbauer, que sugerem um acoplamento entre o centro de Ni e pelo menos um centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$, em determinados estados de redução desta enzima.

V.7-Determinação de potenciais redox

A sequência de espectros da hidrogenase de *D.gigas* por incubação sob hidrogénio sugere a existência de diversas transições de oxidação-redução ao longo do ciclo catalítico da enzima (Figura V.12). Assim, foram efectuadas titulações redox da hi-

drogenase, seguidas por RPE e na presença de mediadores electrónicos, por adição de redutores (ditionito de sódio) ou oxidantes (ferricianeto de potássio) químicos, ou apenas por incubação sob misturas de hidrogénio e argon. Estas titulações permitiram determinar os potenciais redox associados às diversas transições observadas.

V.7.1-Sinais de RPE presentes no Estado Nativo

A titulação foi efectuada entre +300 e -350 mV, por adição de ditionito de sódio ou de ferricianeto de potássio, a pH=8,5. Os potenciais redox foram estimados por medida da intensidade do sinal isotrópico a $g=2,02$, a 4 K, e das intensidades do sinal Ni-A a $g=2,31$ e $g=2,23$, a 77 K, aos vários valores de potencial (Figura V.32).

Ajustaram-se aos dados experimentais curvas de Nernst teóricas para transições monoelectrónicas, estimando-se os valores de potencial redox para os dois processos: o centro $[3Fe-xS]$ reduz-se a um potencial de -70 mV enquanto o desaparecimento do sinal Ni-A está associado a uma transição redox ao potencial de -220 mV. Cammack et al (17) mostraram que o potencial para esta transição é dependente do pH, decrescendo 60 mV por unidade de pH.

O desaparecimento do sinal Ni-A, de acordo com os dados de espectroscopia de Mössbauer, pode ser atribuído a um acoplamento magnético com um centro $[4Fe-4S]^{1+}$, formado pelo processo a -220 mV. O valor de E'_0 para este centro, -220 mV a pH=8,5, é um pouco mais elevado que os valores geralmente encontrados para centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ em ferredoxinas. A sua dependência com o pH

indica a proximidade de um grupo ionizável.

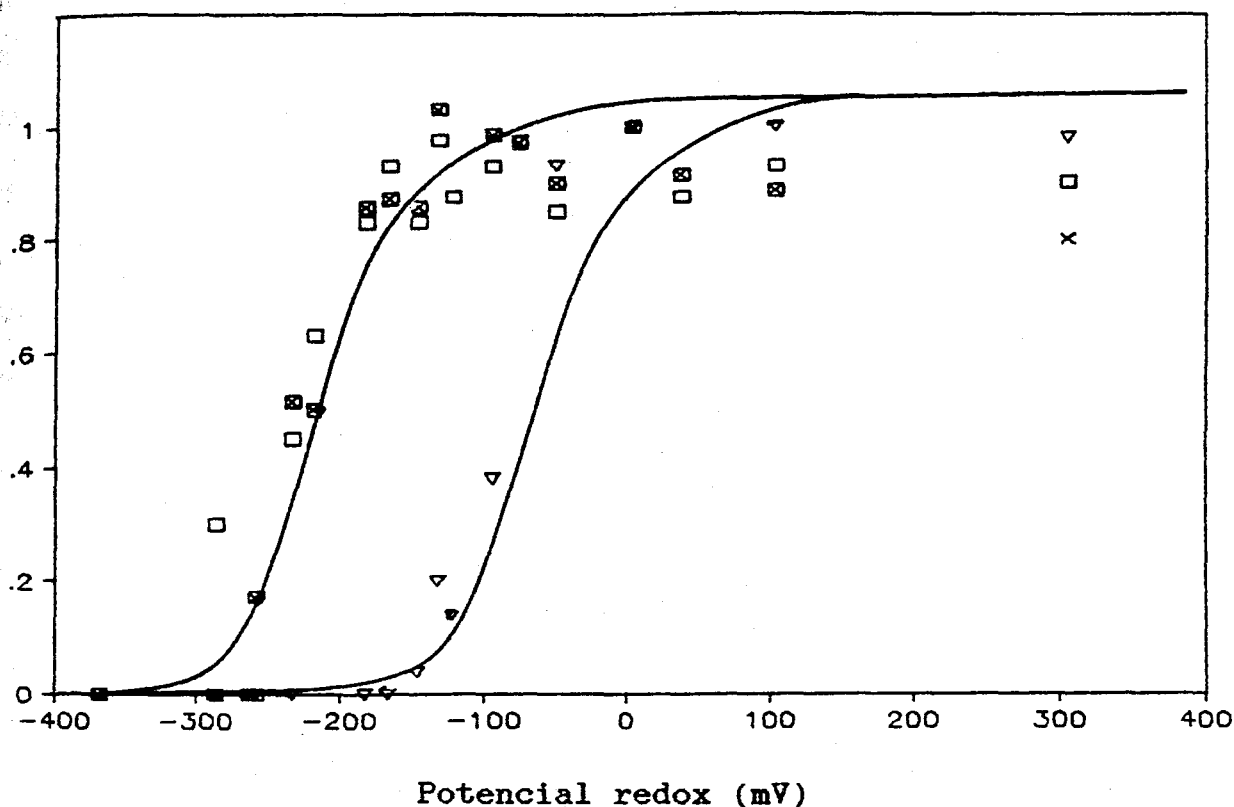


Figura V.32: Titulação redox dos sinais de RPE hidrogenase de *D. gigas* no estado nativo
Intensidade dos sinais de RPE em função do potencial redox, a pH=8,5. As curvas traçadas são o resultado de ajuste com a equação de Nernst para $n=1$ e $E_0'=-220$ mV e $E_0'=-70$ mV. Temperatura : 77 K (□) $g=2,31$; (X) $g=2,23$; 4 K (▽) $g=2,02$

O valor de E_0' obtido para o centro $[3Fe-xS]$, -70 mV, é da ordem de grandeza dos potenciais conhecidos para este tipo de centro.

V.7.2-Espécies intermediárias

Efectuaram-se também titulações redox seguidas por RPE para a determinação dos potenciais redox associados à formação e desaparecimento dos sinais a $g=2,19$ e $g=2,21$, por medição da intensidade dos sinais a 20 K e 77 K ($g=2,19$) e a 4 K ($g=2,21$).

Estas titulações foram realizadas por adição de ditionito de sódio ou apenas por incubação sob misturas de hidrogênio e argon.

V.7.2.1-Titulação com ditionito de sódio

A titulação com o redutor químico a pH=8,5 (Figura V.33) permitiu estimar os valores de potencial para o aparecimento do sinal a $g=2,19$ (inferior a -330 mV) e para o seu desaparecimento (inferior a -390 mV). O máximo de intensidade ocorre entre -350 e -380 mV.

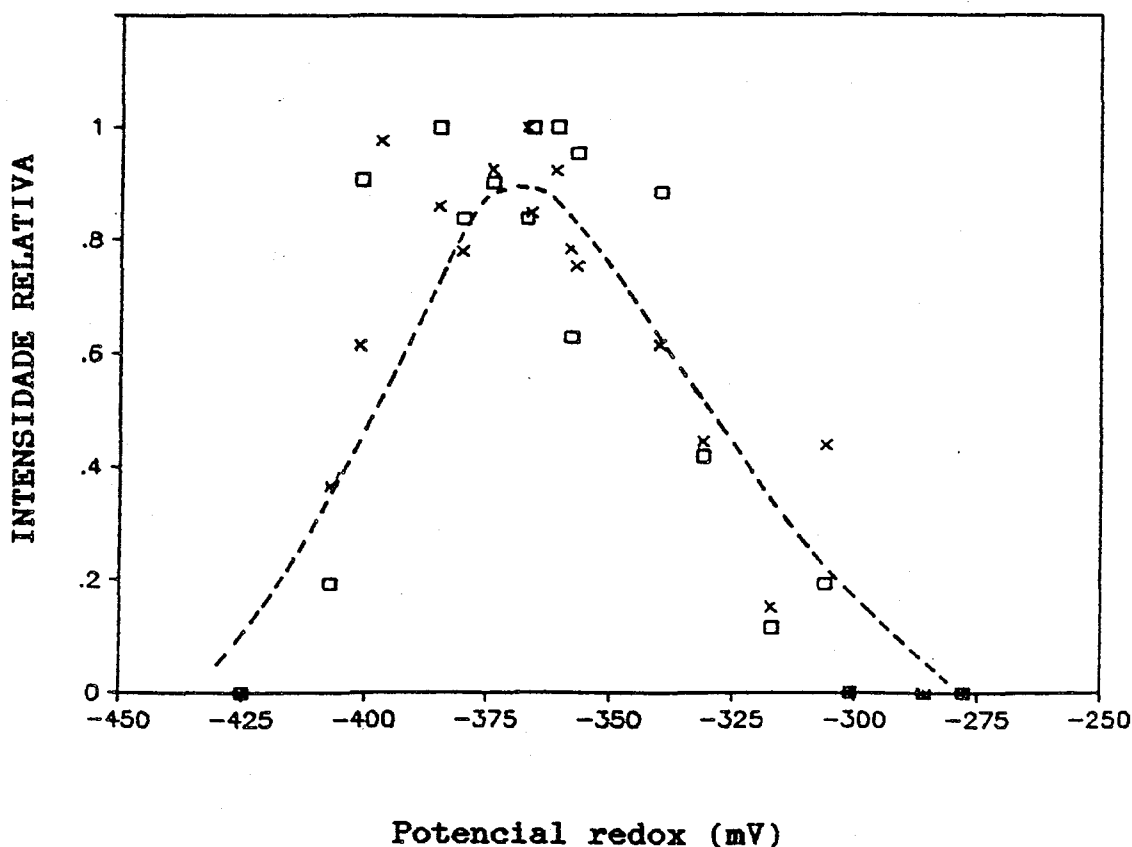


Figura V.33: Titulação redox do sinal a $g=2,19$ da hidrogenase de *D.gigas* por adição de ditionito de sódio. Intensidade relativa do sinal a $g=2,19$ (□) e a $g=2,14$ (X), a 77 K, em função do potencial redox, a pH=8,5

Foram realizadas três titulações independentes. Verificou-se que o equilíbrio com os electrodos é lento, mesmo na presença de mediadores, o que, em conjunto com a natureza transiente deste sinal e com o facto de as titulações terem sido realizadas em condições em que a hidrogenase produz hidrogénio, pode explicar a dispersão de pontos experimentais. Observou-se também, embora de modo qualitativo, que os potenciais associados a este sinal são dependentes do pH.

Esta titulação não permitiu observar o sinal a $g=2,21$ a 4 K, bem como os sinais de RPE de centros $[4Fe-4S]^{1+}$.

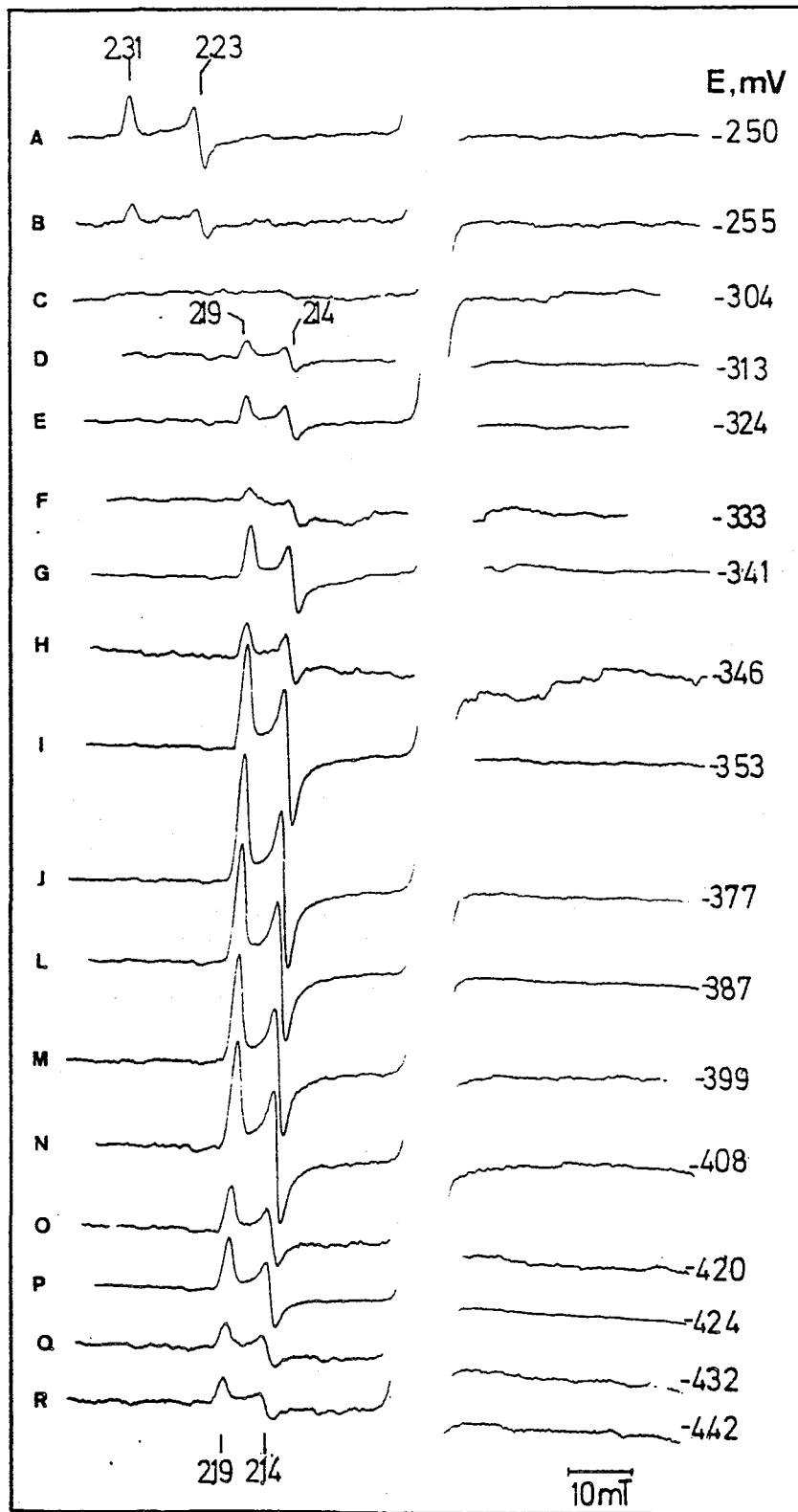
V.7.2.2-Titulações sob hidrogénio

Foram também realizadas duas titulações da hidrogenase de *D.gigas* sob hidrogénio, entre -200 e -450 mV e a pH=8,0, na presença de mediadores redox, seguidas por espectroscopia de RPE. A intensidade dos sinais de RPE foi medida a 20 K (sinal a $g=2,19$) e a 4 K (sinal a $g=2,21$). Os resultados obtidos encontram-se nas figuras V.34-V.36.

Representou-se a intensidade dos sinais em percentagem da intensidade máxima observada, pois não foi possível determinar o valor da concentração máxima da espécie associada ao sinal a $g=2,21$ e por a intensidade máxima do sinal a $g=2,19$ não ser ainda conhecida com exactidão, como já foi referido.

O sinal a $g=2,19$ desenvolve-se a valores de potencial inferiores a -300 mV, apresenta uma intensidade máxima perto de -380 mV e decresce de intensidade a potenciais mais negativos.

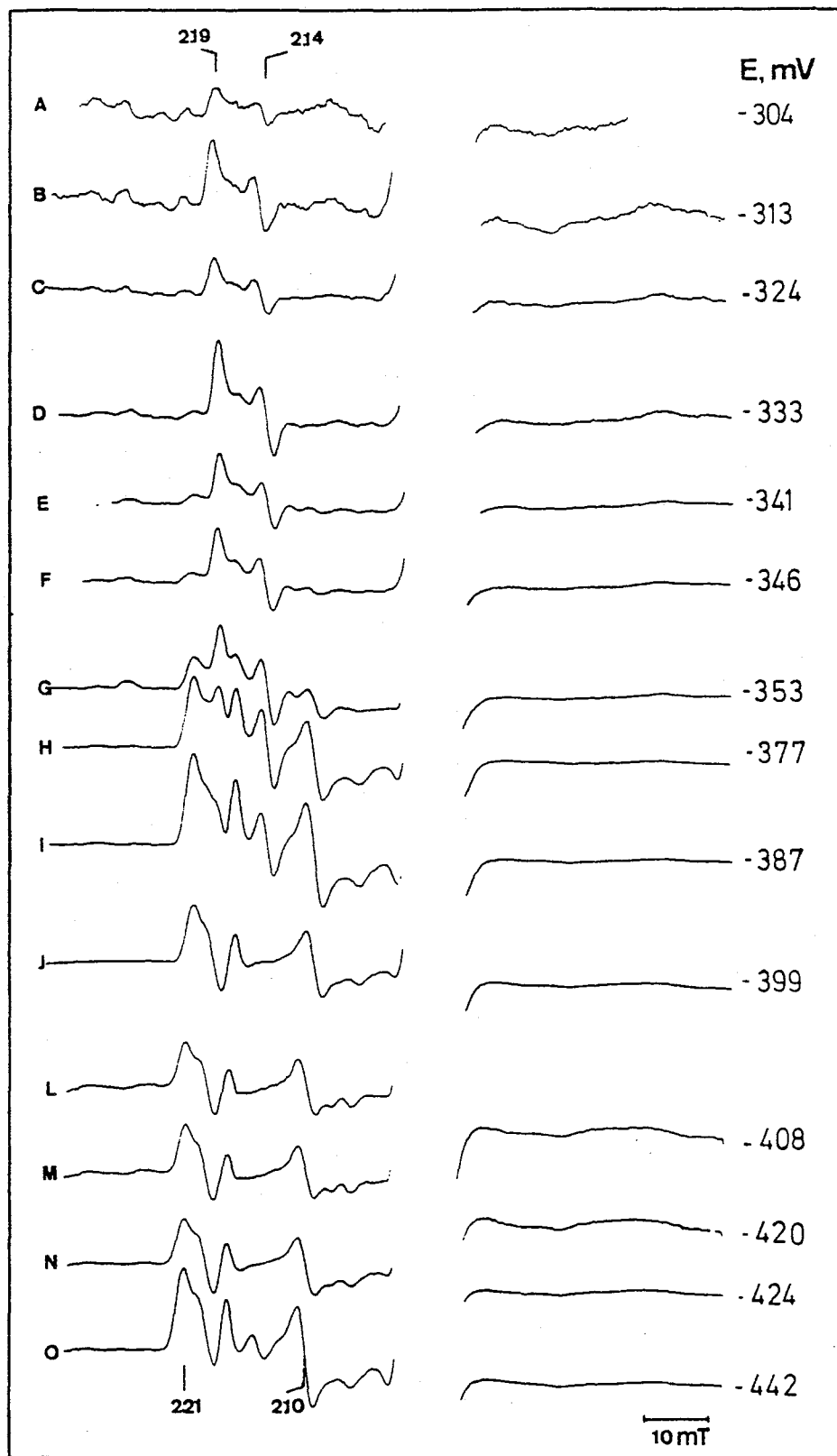
INTENSIDADE RELATIVA



CAMPO MAGNETICO →

Figura V.34: Evolução dos sinais de RPE a 20 K ao longo da titulação redox sob H_2 da hidrogenase de *D. gigas*. Potencial Redox (mV)- A:-250; B:-255; C:-304; D:-313; E:-324; F:-333; G:-341; H:-346; I:-353; J:-377; L:-387; M:-399; N:-408; O:-420; P:-424; Q:-432; R:-442. Ganho: A,B- $2,5 \times 10^5$; C- $3,2 \times 10^5$; D-F - $2,5 \times 10^5$; G- $1,6 \times 10^5$; H- $3,2 \times 10^5$; I-L - 2×10^5 ; M-O - $3,2 \times 10^5$; P-R - 4×10^5 . Potência: 2 mW; Modulação: 1 mT; Frequência: 9,41 GHz

INTENSIDADE RELATIVA



CAMPO MAGNETICO →

Figura V.35: Evolução dos sinais de RPE a 4 K ao longo da titulação redox sob H_2 da hidrogenase de *D-gigas*
 Potencial Redox (mV)- A:-304; B:-313; C:-324; D:-333; E:-341; F:-346; G:-353; H:-377; I:-387; J:-399; L:-408; M:-420; N:-424; O:-442
 Ganho: A,B- 2×10^5 ; C,D- 8×10^4 ; E-O 4×10^4
 Potência: 2 mW; Modulação: 1 mT; Frequência: 9,41 GHz

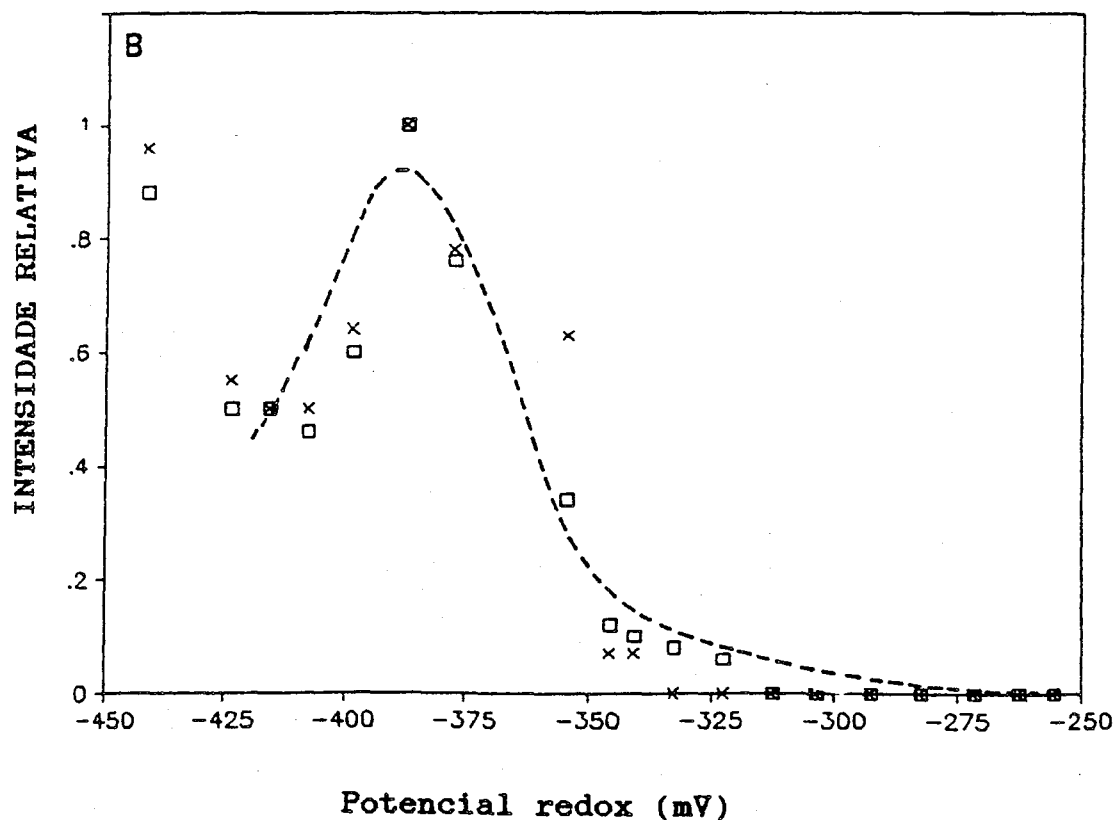
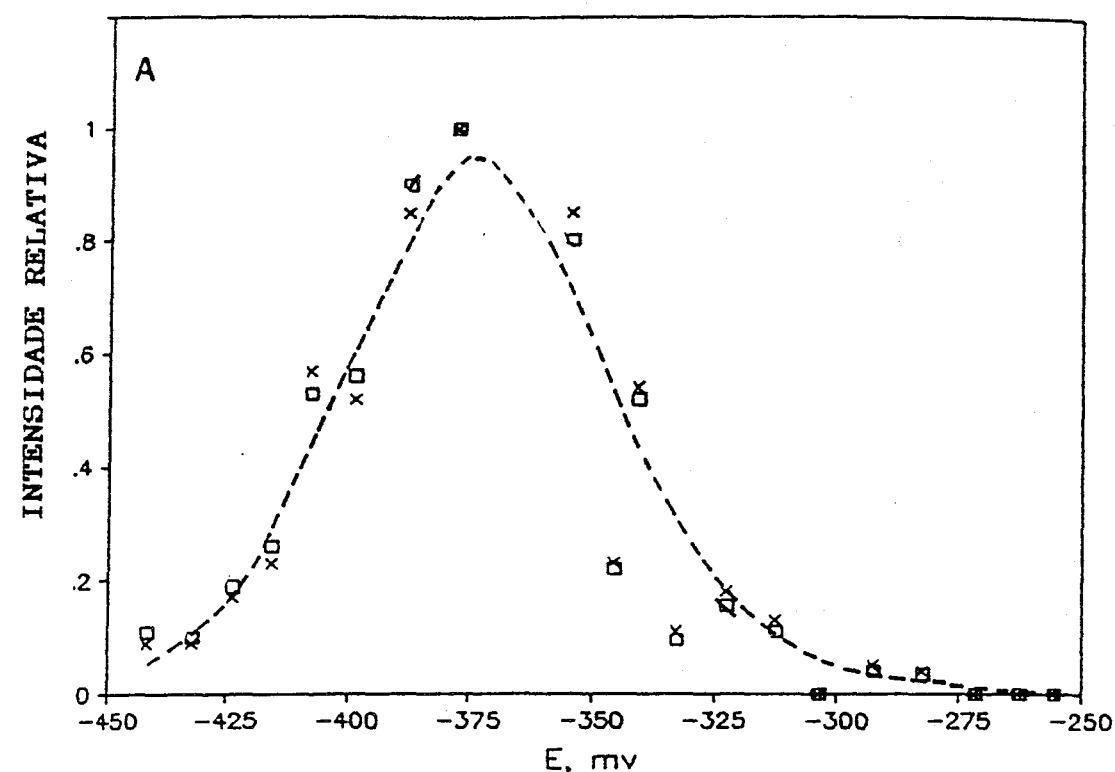


Figura V.36: Titulação redox dos sinais intermediários da hidrogenase de *D. gigas* sob H_2
 Intensidade dos sinais de RPE em função do potencial redox a pH=8.0. (Intensidade relativa ao valor máximo)
 Temperatura : A -20 K (\square), $g=2,19$; (\times) $g=2,16$
 B - 4 K (\square), $g=2,21$; (\times) $g=2,10$

O sinal a $g=2,21$ aparece a valores de potencial mais negativos que o sinal Ni-C (perto de -350 mV) e atinge um máximo de intensidade a cerca de -400 mV. A potenciais inferiores nota-se um ligeiro decréscimo na intensidade do sinal a $g=2,21$. Uma análise detalhada das curvas de titulação permite determinar que as espécies associadas aos sinais a $g="2,19"$ e a $g="2,21"$ têm potenciais redox muito próximos. A diferença mais significativa reside na diminuição de intensidades a potenciais inferiores a -400 mV: enquanto o sinal Ni-C a -440 mV tem uma intensidade quase desprezável, o sinal a $g="2,21"$ a este potencial apresenta uma intensidade próxima de 50% do valor máximo.

Tal como na titulação anterior com ditionito, não se detectaram sinais de RPE de centros ferro-enxofre reduzidos.

Quando se realizaram estas titulações verificou-se que só ao fim de tempos relativamente longos (2-3h) de redução sob H_2 se dá uma diminuição rápida do potencial redox. Durante aquele intervalo de tempo o potencial decresce lentamente, atingindo apenas valores perto de -300 mV. Após algum tempo de incubação a este valor, dá-se então um rápida diminuição de potencial, chegando-se facilmente a cerca de -440 mV. Foram retiradas algumas amostras de hidrogenase durante a primeira fase de redução, observando-se no espectro de RPE uma pequena contribuição do sinal Ni-B ($g=2,33$) ou, imediatamente depois de se ter atingido o valor de -440 mV, um estado silencioso em RPE. Os sinais a $g=2,21$ e a $g=2,19$ desenvolvem-se apenas ao fim de algum tempo (cerca de $1/2h$) a este potencial. Estes resultados, embora de carácter qualitativo, parecem indicar que, tal como se observa nos estudos de actividade da enzima, é necessário um certo tempo

de incubação sob H_2 para que a enzima seja activa. Além disso, sugerem ainda que a espécie silenciosa em RPE representa a forma activa da enzima e que o sinal a $g=2,19$ pode ser devido a uma espécie transiente envolvida no ciclo catalítico da hidrogenase. Estes dados serão discutidos mais pormenorizadamente no final deste capítulo.

V.7.3-Caracterização dos sinais de RPE a $g=2,19$ e a $g=2,21$

Os dados obtidos nas titulações anteriores permitiram também uma melhor caracterização dos sinais de RPE a $g=2,19$ e $g=2,21$. Existem estados de redução em que praticamente só se observa o sinal a $g=2,19$ ($E=-333$ e $E=-341$ mV) ou o sinal a $g=2,21$ ($E=-442$ mV). O sinal a $g=2,21$ desenvolve-se, pois a potenciais ligeiramente inferiores aos do sinal Ni-C.

Devido às diferentes propriedades de relaxação, já mencionadas anteriormente, é possível, por variação da potência de microondas, estudar ambos os sinais a cada valor de potencial redox. Nas figuras V.37-V.40 mostra-se a variação dos sinais de RPE a quatro valores diferentes de potencial redox (-313 , -353 , -393 e -442 mV) com a potência de microondas.

Nota-se novamente que o sinal a $g=2,21$ corresponde a uma espécie de relaxação rápida, sendo dificilmente detectável a baixos valores de potência, enquanto o sinal a $g=2,19$ satura rapidamente com a potência de microondas. Esta propriedade permite, a baixas temperaturas, detectar quais os estados em que ambos os sinais ou apenas o sinal a $g=2,21$ estão presentes.

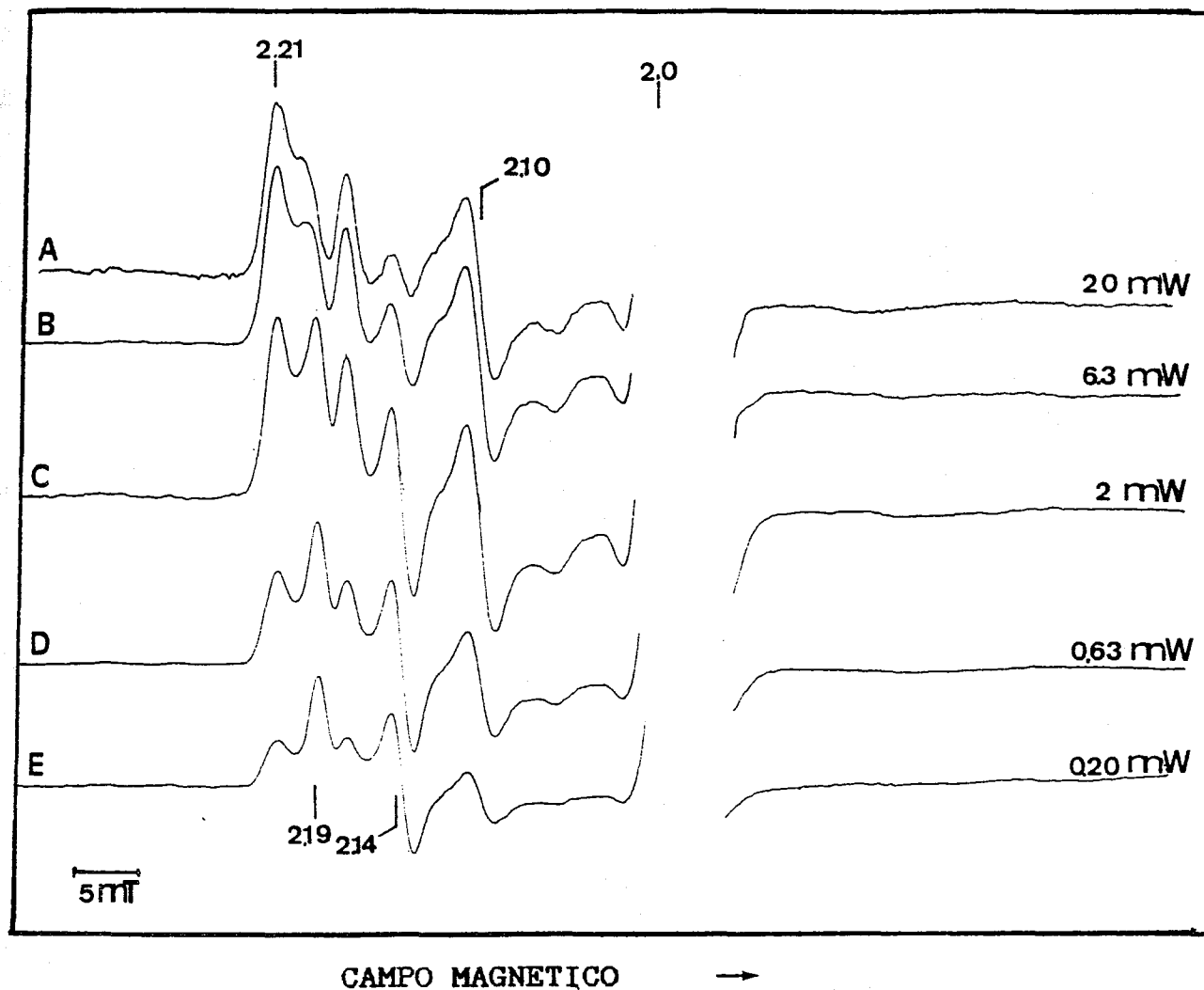


Figura V.37: Variação do sinal de RPE da hidrogenase de *D. gigas* a -313 mV com a potência de microondas
 Potência e ganho: A- 20 mW, 8×10^3 ; B- 6,3 mW, $1,25 \times 10^4$
 C- 2 mW, $2,5 \times 10^4$; D- 0,63 mW, $2,5 \times 10^4$; E- 0,2 mW, $2,5 \times 10^4$
 Temperatura: 4,2 K; Modulação: 1 mT;
 Frequência: 9,41 GHz

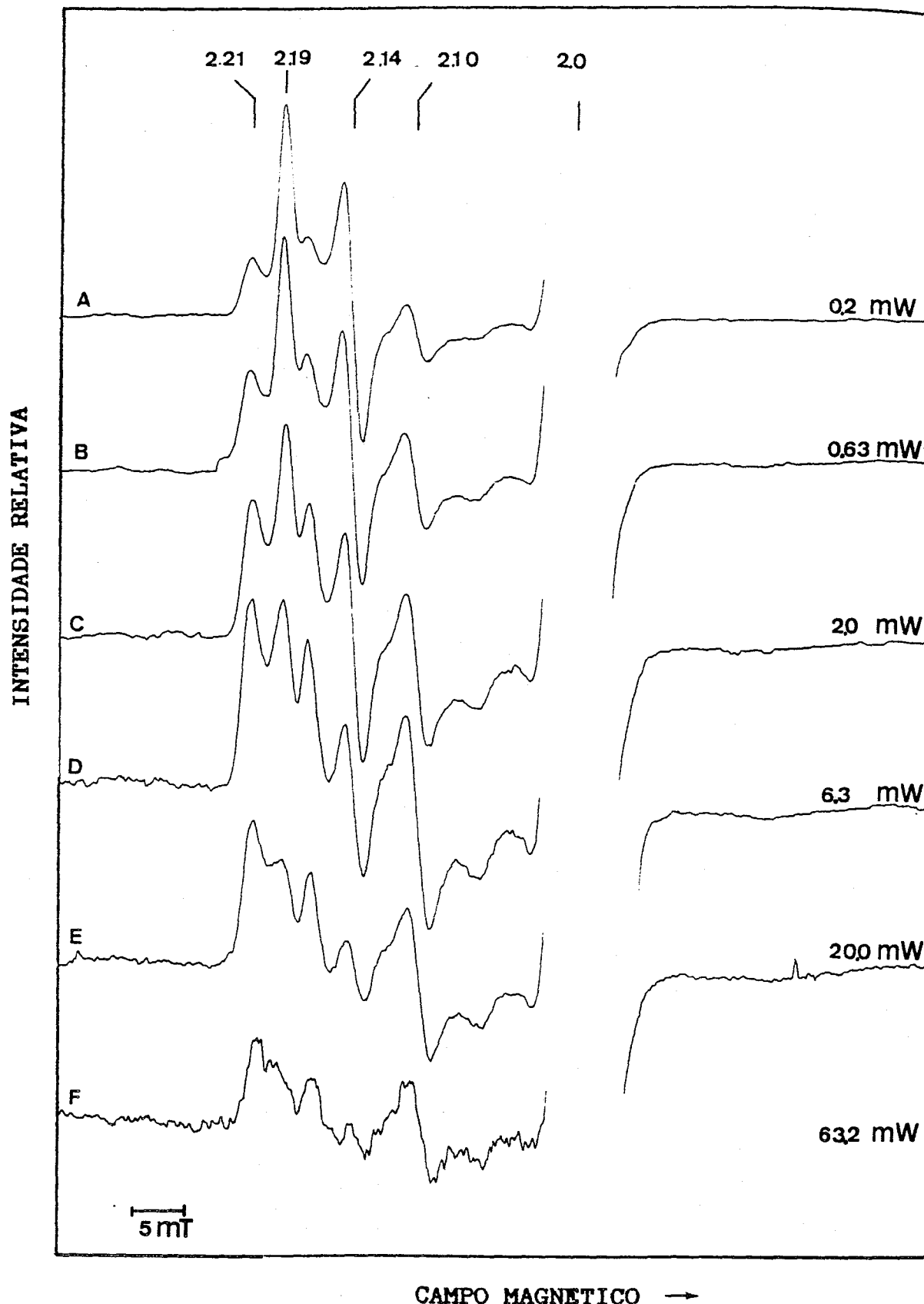
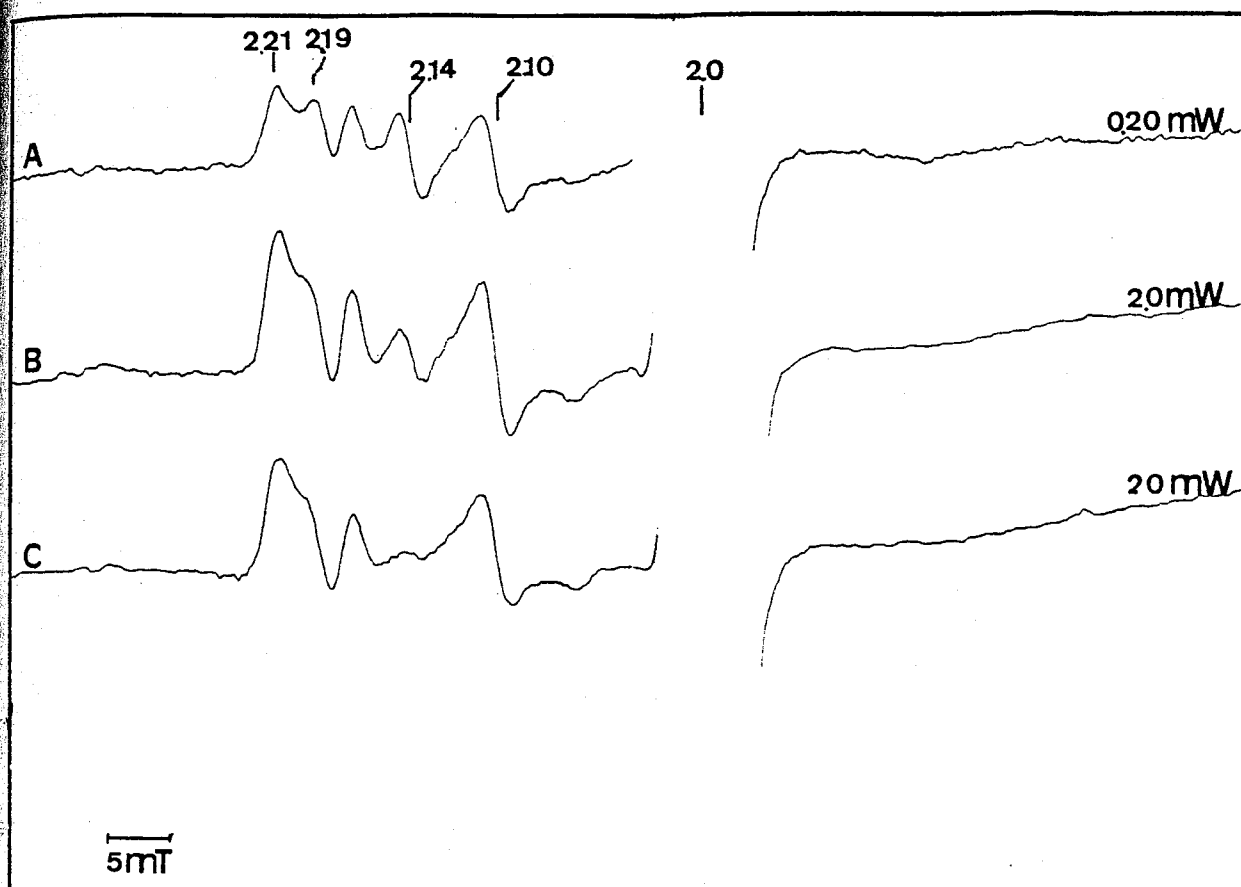


Figura V.38: Variação do sinal de RPE da hidrogenase de *D. gigas* a -353 mV com a potência de microondas
 Potência e ganho: A- 0,2 mW, $6,38 \times 10^4$; B- 0,63 mW, 4×10^4 ; C- 2 mW, $3,2 \times 10^4$; D- 6,3 mW, $2,5 \times 10^4$; E- 20 mW, $1,25 \times 10^4$; F- 63,2 mW, $1,25 \times 10^4$
 Temperatura: 4,2 K; Modulação: 1 mT;
 Frequência: 9,41 GHz



CAMPO MAGNETICO →

Figura V.39: Variação do sinal de RPE da hidrogenase de *D. gigas* a -393 mV com a potência de microondas
 Potência e Ganho: A- $0,20$ mW, $1,25 \times 10^5$; B- 2 mW, 5×10^4
 C- 20 mW, $1,6 \times 10^4$
 Outras condições como na Fig.V.37

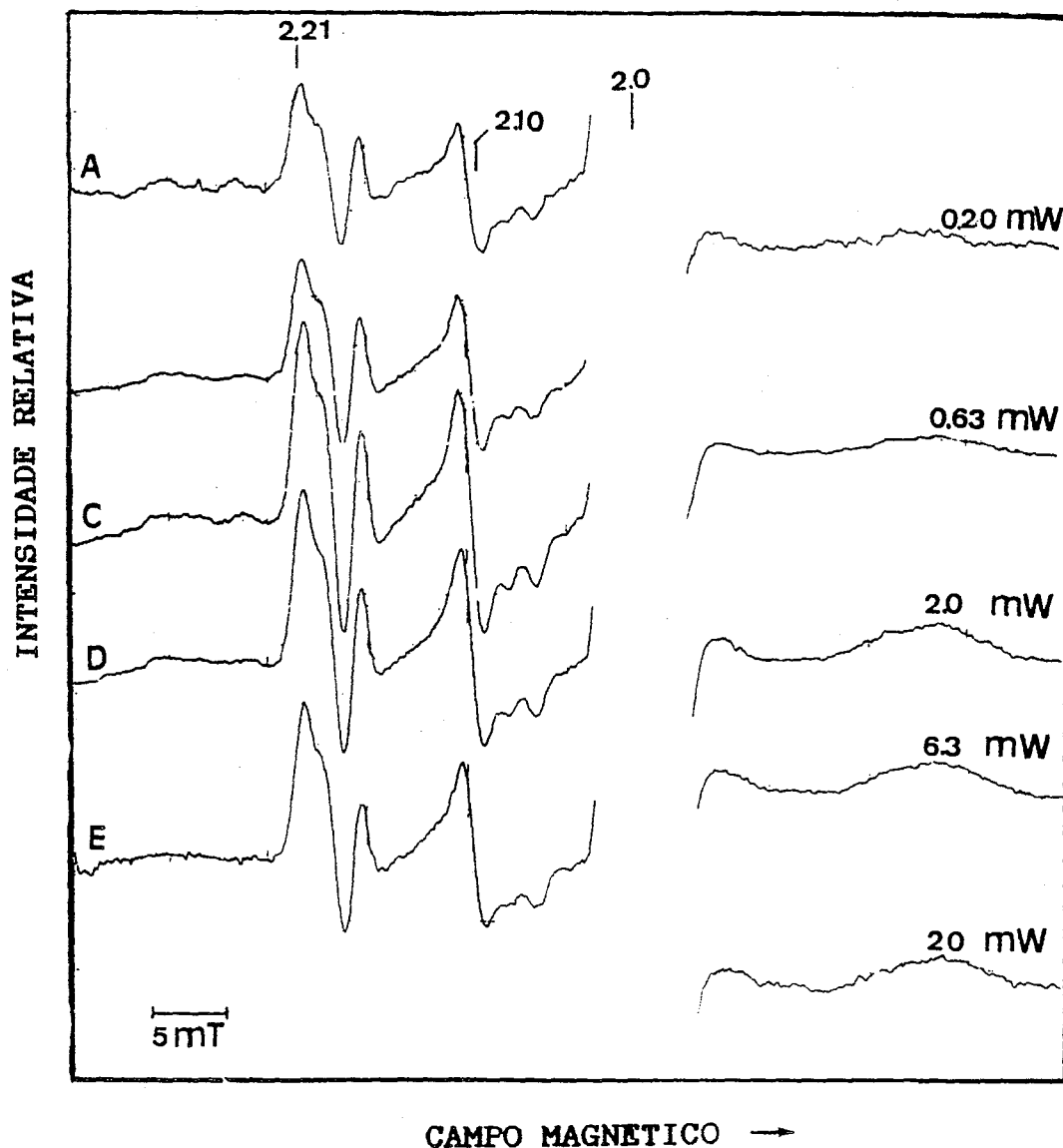


Figura V.40: Variação do sinal de RPE da hidrogenase de *D. gigas* a -442 mV com a potência de microondas
Potência e Ganho: A- 0,2 mW, 2×10^5 ; B- 0,63 mW, 10×10^4
C- 2 mW, 8×10^4 ; D- 63 mW, 4×10^4 ; E- 20 mW, $2,5 \times 10^4$
Outras condições como na Fig.V.37

Assim, constata-se que a potenciais redox inferiores a cerca de -390 mV o sinal a $g=2,19$ apresenta intensidades muito fracas, sendo o espectro de RPE dominado, a potenciais inferiores áquele, pelo sinal a $g=2,21$. Este facto permite ainda uma simplificação da análise dos espectros mais complexos obtidos para estados redox em que ambas as espécies estão presentes. Nas figuras V.41 e V.42 mostram-se os sinais

obtidos a 20 e 4,6 K, para os potenciais redox de -353 e -442 mV. Os espectros inferiores de ambas as figuras são obtidos por subtração do sinal a alta temperatura ao sinal a baixa temperatura, revelando apenas as características espectrais do sinal a $g=2,21$ e indicando claramente que os espectros complexos resultam da sobreposição de ambos os sinais.

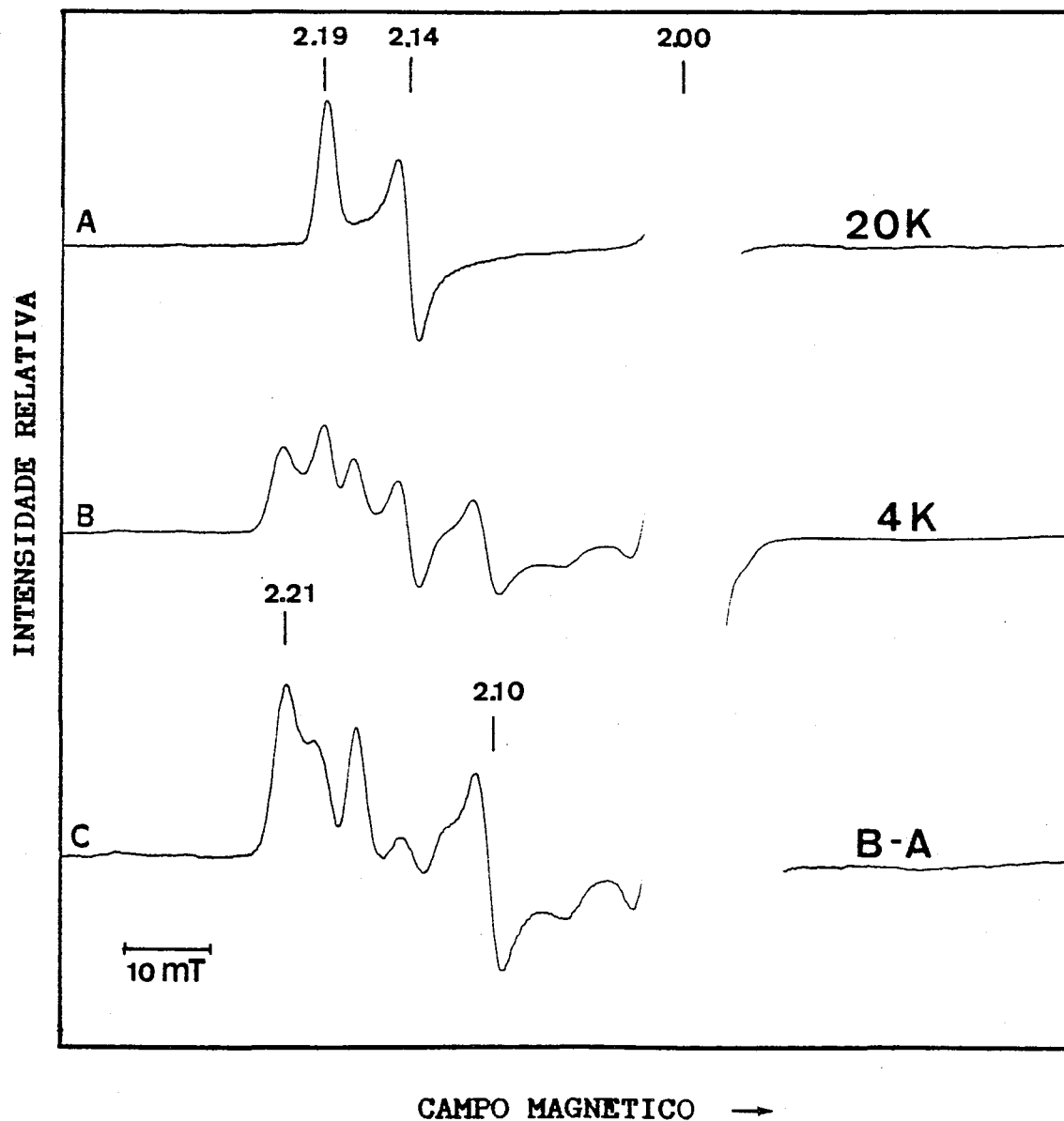


Figura V.41: Sinais de RPE a 20(A) e 4 K (B) da hidrogenase de *D.gigas* a -353 mV. C- Espectro de diferença B-A
 Ganho e Potência: A- 20 mW, $1,25 \times 10^5$; B- 2 mW, $6,3 \times 10^4$
 Modulação: 1 mT; Frequência: 9,41 GHz

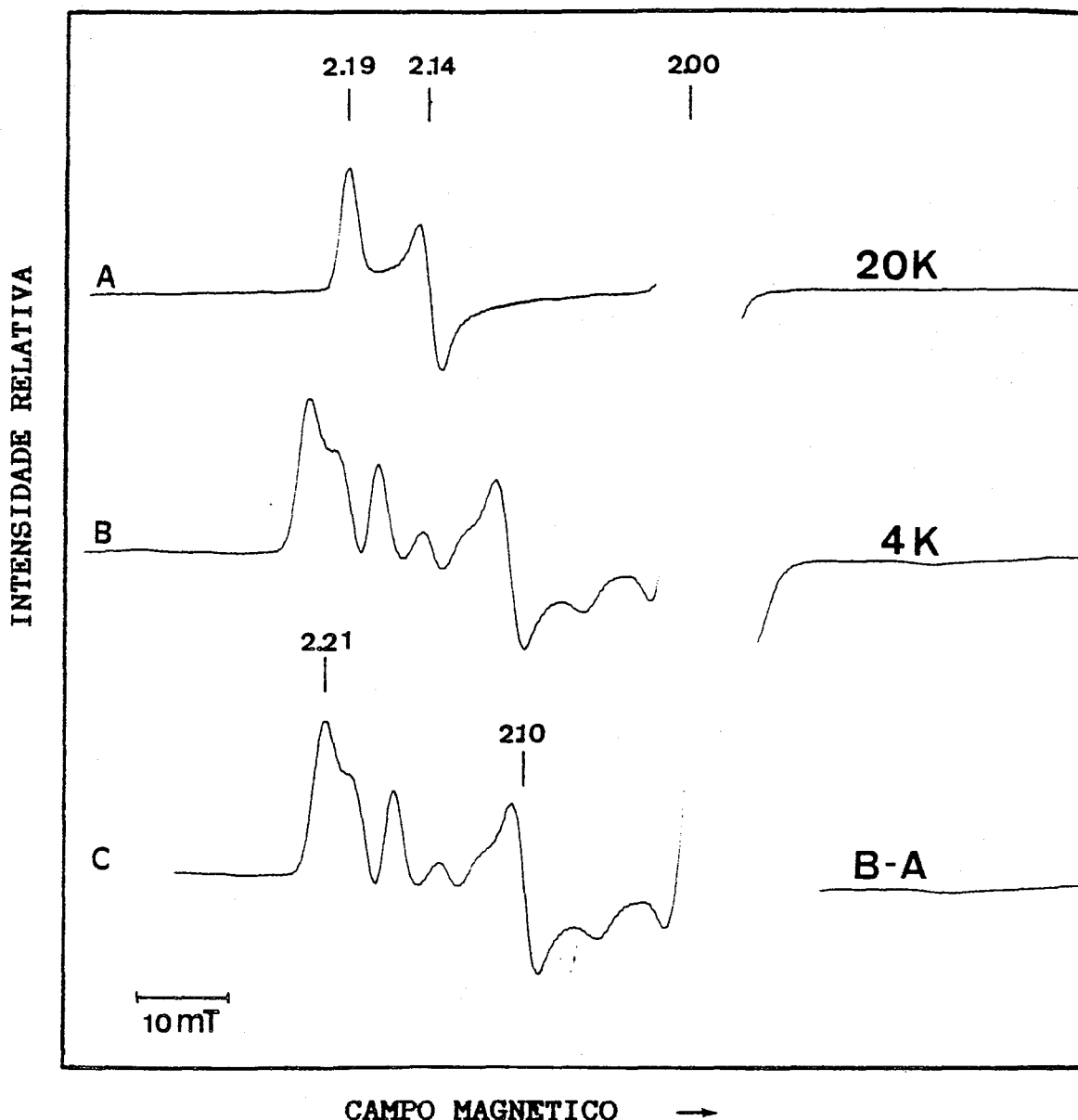
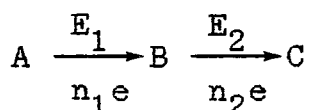


Figura V.42: Sinais de RPE a 20(A) e 4 K (B) da hidrogenase de *D. gigas* a -442 mV. C- Espectro de diferença B-A. Potência e Ganho: A-2 mW, 2×10^5 ; B-20 mW, $6,3 \times 10^4$. Outras condições como na Fig. V.41

Estes resultados parecem indicar que os sinais a $g = 2,21$ e a $g = 2,19$ (Sinal Ni-C) têm origem em espécies distintas, com potenciais redox ligeiramente diferentes. Porém, não foi possível ainda identificar a origem do sinal a $g = 2,21$.

V.7.4-Análise das curvas de titulação

As curvas de titulação obtidas para os sinais a $g=2,19$ e $g=2,21$ apontam para a ocorrência de processos de redução consecutivos. Assim, tentou-se o ajuste de curvas de Nernst aos dados experimentais, para processos redox do seguinte tipo (Ver apêndice):



A espécie B representa a espécie intermediária, sendo E_1 o potencial associado ao seu aparecimento e E_2 o potencial associado ao seu desaparecimento. Para este tipo de ajuste, efectuado somente por comparação visual das curvas teóricas com os pontos experimentais, é necessário conhecer os valores de intensidade máxima de ambos os sinais. Como já foi referido, apenas para o sinal a $g=2,19$ se dispõe de uma estimativa deste valor ($0,4-0,6$ spin/mol) pelo que só podem ser comparados os valores experimentais e teóricos para este sinal. Na tabela V.9 mostra-se a intensidade máxima da espécie intermediária B calculada por este modelo e atribuindo diversos valores para a diferença de potenciais redox E_1-E_2 . Na figura V.43 representam-se novamente todos os pontos experimentais obtidos para as titulações redox da hidrogenase de *D.gigas* (sob hidrogénio e com ditionito de sódio) e mostram-se algumas das curvas teóricas obtidas.

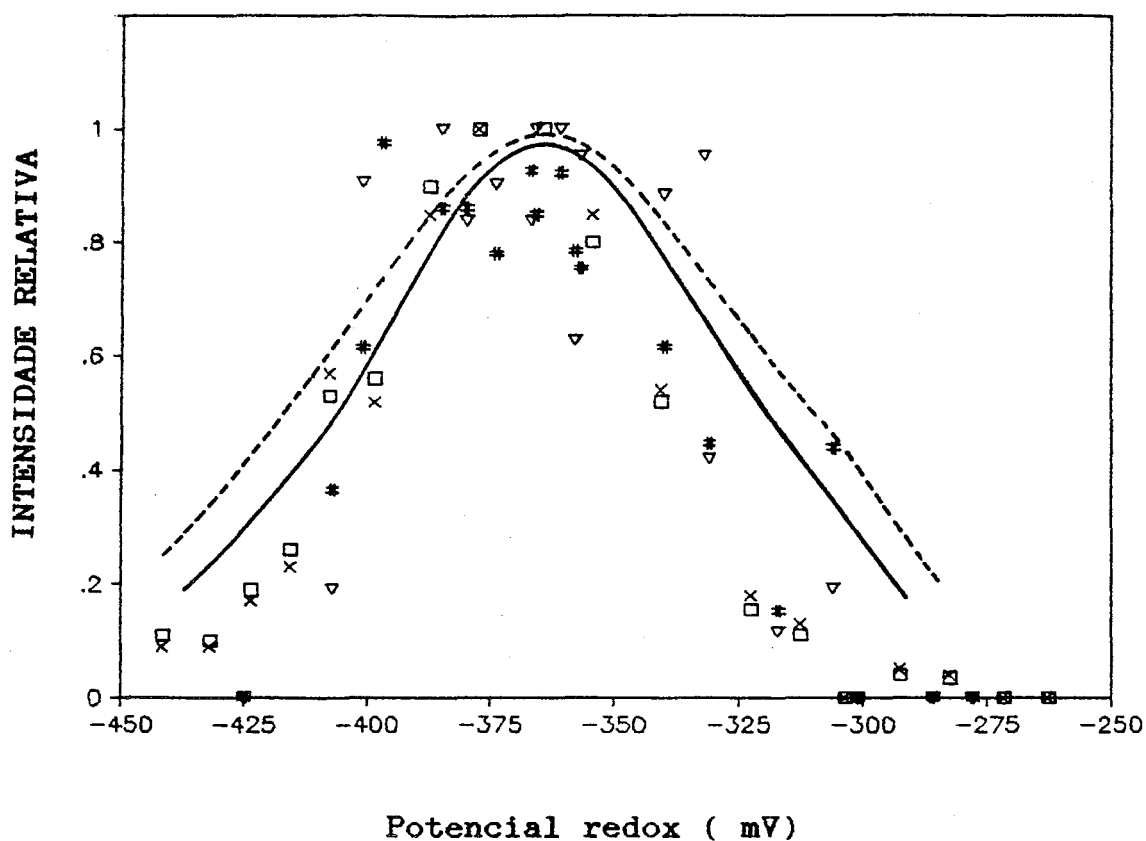


Figura V.43: Curva de titulação redox para o sinal
a $g=2,19$ da hidrogenase de *D. gigas*
 \square, \times Titulação sob H_2
 $\nabla, *$ Titulação com ditionito de sódio
 Curva teórica para $E=0$
 Curva teórica para $E=-60$ mV

TABELA V.9: Intensidade máxima da espécie
intermediária em função de E_1-E_2

E_1-E_2	P_B (max)
0	0,33
-20	0.423
-30	0.469
-40	0.512
-50	0.565
-60	0.612

Confrontando as curvas teóricas com as curvas experimentais (Figura V.43), verifica-se que mesmo para uma diferença de potencial nula para ambos os processos redox as curvas teóricas não conduzem a um bom ajuste dos dados experimentais, para além de não se obter uma boa concordância com os valores de intensidade da espécie intermediária. Conforme descrito em apêndice foram tentados ajustes com outros modelos, envolvendo maior número de passos de redução ou introduzindo transições bielectrónicas; embora se obtenha uma melhor concordância com os valores experimentais, não é ainda possível uma discussão dos modelos considerados com base nos dados disponíveis, pelo que uma elucidação definitiva deste ponto requer a identificação inequívoca dos processos redox e da origem das espécies paramagnéticas observadas por RPE, associadas aos sinais a $g=2,19$ e a $g=2,21$.

VI.8-Discussão - Hipóteses Mecanísticas

Nesta secção tentar-se-á correlacionar os resultados obtidos pelos estudos espectroscópicos e pela determinação de potenciais redox dos centros da hidrogenase de *D.gigas* com os estudos de actividade enzimática, apresentados no capítulo IV, de modo a formular algumas hipóteses de mecanismo molecular de activação e produção/consumo de hidrogénio por esta enzima. Discutir-se-ão essencialmente as seguintes questões:

- atribuição dos sinais de RPE e dos potenciais redox a centros enzimáticos;
- estados de oxidação do centro de níquel ao longo do ciclo

catalítico;

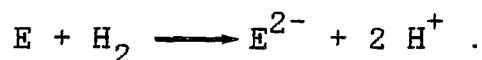
- interacção específica entre os centros enzimáticos;
- identificação dos vários estados intermediários do ciclo catalítico;
- função de cada centro metálico e, em particular, identificação do centro onde ocorre a activação da molécula de hidrogénio;

Muitos destes pontos ainda não podem ser integralmente respondidos. Porém, o conjunto de dados de que se dispõe permite desde já formular algumas hipóteses e construir um modelo que possa servir de base de discussão e para futuros desenvolvimentos através de experiências delineadas para comprovar o modelo ou para responder a questões que surgirão ao longo desta discussão.

Qualquer hipótese mecanística tem que tomar em consideração os dados anteriormente apresentados quer em relação à actividade enzimática quer em relação à constituição dos centros activos da hidrogenase. Estes dados serão sucintamente enumerados.

-Reacção enzimática-

A enzima hidrogenase está envolvida na reacção



A reacção directa consiste na oxidação da molécula de hidrogénio, libertando-se dois protões e sendo a enzima reduzida por dois electrões, que serão transferidos para os aceitantes exógenos fisiológicos; na reacção inversa, a enzima reduz dois protões, formando-se a molécula de H_2 , a partir de electrões cedidos por um doador electrónico exógeno. Estas reacções sugerem que a enzima nos passos centrais do ciclo catalítico oscilará

entre estados de oxidação separados por duas unidades, interrelacionados através de reacções mono ou bielectrónicas.

-Activação da molécula de hidrogénio-

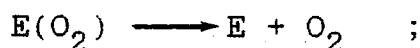
A activação da molécula de hidrogénio dá-se por uma cisão heterolítica, isto é, a hidrogenase cinde a molécula de H_2 em um ião hidreto e um protão:



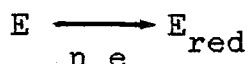
De acordo com a discussão dos mecanismos de activação de hidrogénio por iões de metais de transição, não se pode excluir a existência de um passo inicial, rápido, de adição oxidativa de hidrogénio, que daria então origem aos produtos da cisão heterolítica.

-Activação da enzima-

A enzima no estado em que é isolada (que, por comodidade de expressão, será designado por estado nativo), não é activa. É necessária a sua activação, por um processo bifásico (23,24): a primeira fase, mais lenta, parece corresponder á desoxigenação da enzima



a segunda fase, mais rápida, consiste na redução de centros enzimáticos Fe/S, de acordo com a observação por espectroscopia de visível da diminuição da absorvância da hidrogenase a 400 nm, sob hidrogénio



A fase de redução, na presença de H_2 , está associada a um processo redox monoelectrónico, com um potencial de -350 mV a pH=8, dependente do pH (decréscimo de 60 mV por unidade de pH)

(24). Após esta activação, Merge *et al* (25) verificaram que a enzima é inactivada pelo potencial, através de um processo mono-electrónico dependente do pH, com $E'_0 = -220$ mV a pH=8,5.

Estes dados levam a enumerar uma série de estados enzimáticos envolvidos nos ciclos de activação e catalítico:

- $E(O_2)$: enzima oxigenada, inactiva;
- E : enzima desoxigenada, que se poderá designar por "ready state", no sentido em que a enzima "está pronta" para iniciar a sua activação;
- E_{red} : enzima reduzida, activada, que constituirá o estado activo, isto é, o estado enzimático em que a activação da molécula de hidrogénio é possível.
- $E_{red}-H^-$: complexo intermediário enzima-hidreto;
- E_{red}^{2-} : Estado final, "super reduzido", após a oxidação do ião hidreto e libertação dos protões.

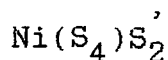
Nas alíneas seguintes tentar-se-á a identificação destes estados intermediários com os estados de oxidação/redução de cada grupo prostético da enzima.

-Grupos prostéticos da hidrogenase-

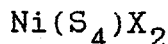
Os dados de análise química, das espectroscopias de RPE e Mössbauer e de EXAFS permitiram uma identificação preliminar dos grupos prostéticos da hidrogenase de *D.gigas*. Esta enzima contém quatro centros metálicos:

- Centros Fe/S - um centro $[3Fe-xS]$ e dois centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$
- Centro de níquel - um centro contendo um ião níquel que, no estado nativo, está coordenado pelo menos a quatro átomos de enxofre. Scott *et al* (25), através da técnica espectroscópica de

EXAFS, propuseram que a coordenação do centro de níquel no estado oxidado da hidrogenase de *D.gigas* poderia ser do tipo



onde S_4 serão átomos de enxofre presentes numa primeira esfera de coordenação, a cerca de 0,21 nm do ião Ni(III) , e S' representam dois átomos de enxofre um pouco mais distantes (0,23 nm) daquele ião. Outra hipótese dos autores é uma coordenação



onde X representa átomos coordenantes mais leves, eventualmente N ou O, a cerca de 0,19 nm do ião níquel. Em qualquer dos casos, o ião Ni(III) estaria numa geometria octaédrica com distorção tetragonal, de acordo com os dados de RPE. Os átomos de enxofre poderão pertencer a resíduos cisteína da cadeia polipeptídica. A hidrogenase de *D.gigas* contém 21 resíduos S-cis, pelo que possui um número suficiente de cisteínas para coordenar todos os centros Fe/S (são necessárias 12 cisteínas para esta coordenação) e o ião Ni(III) . Os valores determinados para o conteúdo em enxofre lábil, S^* , (11-12 átomo-g de S^* por mole de enzima) excluem a possibilidade de coordenação de níquel por este tipo de ião sulfureto.

Os centros Fe/S parecem idênticos aos centros análogos identificados em ferredoxinas, possuindo características espectroscópicas bastante semelhantes às destes centros e oscilando entre dois estados de oxidação interrelacionados por reacções de transferência monoelectrónicas.

Esquemáticamente, a enzima pode ser representada pelo seguinte diagrama:

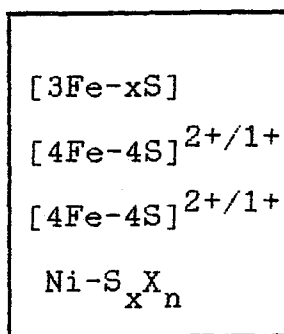


Diagrama V.1: Grupos prostéticos da hidrogenase de *D. gigas*

V.8.1-Ciclo de activação da hidrogenase de *D. gigas*

V.8.1.1-Estado nativo

-Centros Fe/S-

No estado nativo a enzima contém um centro $[3\text{Fe}-x\text{S}]$ oxidado ($S=1/2$), responsável pelo sinal de RPE isotrópico a $g=2,02$, e dois centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/1+}$ oxidados, no estado $+2$ ($S=0$), silenciosos em RPE. Neste estado não há interacção magnética entre estes agregados.

-Centro de Níquel-

Os sinais de RPE a $g=2,31$, $2,23$ e $2,02$ (Sinal Ni-A) e a $g=2,33$, $2,16$ e $2,02$ (Sinal Ni-B) são inequivocamente devidos a um centro paramagnético de níquel, com $S=1/2$, como demonstrado pela observação de desdobramento por interacção hiperfina nas linhas de RPE destes sinais em hidrogenase enriquecida em ^{61}Ni . A questão fundamental na identificação deste sinal reside na atribuição do estado de oxidação do ião níquel. Este ião só pode apresentar sistemas com $S=1/2$ nos estados de oxidação Ni(III) (sistema d^7 de spin baixo) e Ni(I) (sistema d^9). A espectroscopia de RPE, como referido no capítulo II, não permite uma identificação inequívoca destes estados de oxidação: os complexos de

Ni(III) apresentam em geral espectros de RPE rômnicos, com valores de g semelhantes aos dos sinais da hidrogenase (Capítulo II), o que tem levado a atribuir estes sinais a um centro de Ni(III) nesta enzima. Pelo contrário, os complexos de Ni(I) apresentam geralmente sinais de RPE mais axiais mas, variando a estrutura dos ligandos, é possível obter sinais rômnicos com valores de g muito próximos dos observados em compostos de Ni(III).

Outro dado relevante da química do níquel são os valores de potencial redox para as transições Ni(III)/Ni(II) e Ni(II)/Ni(I) (Capítulo II). A primeira transição ocorre geralmente a potenciais positivos (cerca de 1 V) enquanto a segunda ocorre a potenciais negativos (perto de -1 V), o que torna qualquer dos estados de oxidação de níquel diferente de Ni(II) instável em solução aquosa. Contudo, são conhecidos compostos de Ni(II) para os quais estas transições se dão a potenciais bastante mais próximos da zona de estabilidade da água, o que permite explicar a estabilidade do ião níquel na hidrogenase. Este facto pressupõe uma estabilidade elevada do estado Ni(III). Os estudos de Margerum *et al* com ligandos peptídicos (27) e de Busch *et al* (28) com ligandos macrocíclicos mostraram que a oxidação do ião Ni(II) a Ni(III) em solução é acompanhada de um aumento do número de coordenação do ião Ni(III) (passagem de quadrangular plano, $n=4$, nos compostos de Ni(II) para octaédrico com distorção tetragonal, $n=6$, ou mesmo apenas pentacoordenado, $n=5$, para os complexos de Ni(III)), que conduz a uma estabilização do estado de oxidação superior. Por outro lado, o facto de a enzima ser estável na presença de oxigénio é, também, compatível com a existência do

estado de oxidação mais elevado Ni(III).

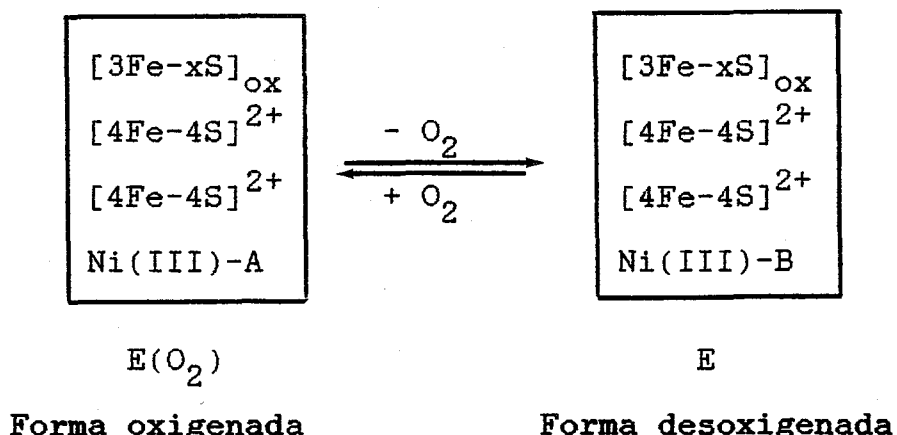
Assim, embora os dados da química inorgânica e de espectroscopia de compostos de níquel não permitam identificar com uma certeza absoluta os estados de oxidação do níquel na hidrogenase, são compatíveis com a atribuição até agora feita para o estado Ni(III) na enzima nativa. No entanto, deve frisar-se novamente que esta hipótese necessita de uma comprovação inequívoca através de outras técnicas espectroscópicas ou pela síntese e caracterização de compostos modelo de Ni(III) com ligandos possuindo átomos coordenantes de enxofre.

A distinção entre os sinais Ni-A e Ni-B advém essencialmente dos ciclos de redução/oxidação efectuados com a hidrogenase de *D. gigas*. Por reoxidação anaeróbica desta hidrogenase, depois de redução sob H_2 , o primeiro sinal de RPE, presente no estado nativo, a revelar-se é o sinal Ni-B que, continuando-se a reoxidação, é progressivamente substituído pelo sinal Ni-A, até se atingir um estado idêntico ao de partida destes ciclos. Este efeito é particularmente nítido quando os ciclos são realizados na presença de citocromo c_3 tetrahémico de *D. gigas* que, aparentemente, se comporta como uma armadilha de oxigénio (Figuras V.25-26). Outra observação indirecta resulta da verificação de que quando a enzima é purificada anaerobicamente e passando ditionito de sódio nas colunas de cromatografia antes de carregar as fracções de proteína, o sinal de RPE da enzima nativa apresenta uma maior percentagem do sinal Ni-B em relação à enzima purificada aerobicamente. Por último, constata-se também, embora de modo qualitativo, que as preparações de hidrogenase contendo maior quantidade deste sinal Ni-B são mais facilmente reduzidas sob

H_2 , isto é, o tempo de incubação necessário para o aparecimento do sinal a $g=2,19$ é muito mais curto. DerVartanian et al (29) verificaram ainda que, após incubação sob O_2 , a relaxação do sinal a $g=2,31$ aumenta significativamente. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho indicam que a relaxação destes sinais na enzima nativa é muito semelhante.

Todos estes dados, quando comparados com os estudos de activação da enzima, sugerem que o sinal Ni-A corresponde à enzima oxigenada e que o sinal Ni-B está associado à enzima desoxigenada.

Os estudos espectroscópicos de RPE e Mössbauer indicam que no estado nativo da enzima contendo os sinais Ni-A e Ni-B não há interacção magnética entre os centros metálicos. Assim, os estados da enzima oxigenada ($E(O_2)$) e desoxigenada (E) podem ser representados pelos seguintes diagramas



Sinais de RPE:

$[3Fe-xS]_{ox} \quad g=2,02$	$[3Fe-xS]_{ox} \quad g=2,02$
<u>Ni-A</u> $g=2,31$, $2,23$, $2,02$	<u>Ni-B</u> $g=2,33$, $2,16$, $2,02$

Diagrama V.2: Formas nativas da hidrogenase de *D.gigas*

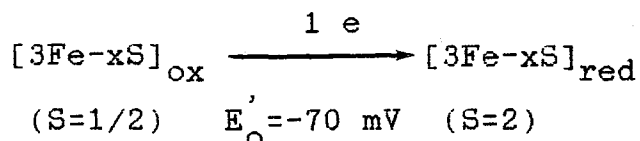
A forma desoxigenada corresponderá ao estado enzimático no qual a enzima se encontra no que tem sido designado por "ready state", isto é, num estado em que a etapa de activação (reduzora) é possível, sendo eliminada a primeira fase de activação.

A hidrogenase de *D.desulfuricans* (ATCC 27774) é semelhante à hidrogenase de *D.gigas*, em termos da constituição dos centros activos (ver capítulo IX). No estado nativo daquela hidrogenase observa-se apenas um sinal de níquel idêntico ao sinal Ni-B; na reacção de produção de hidrogénio desta hidrogenase não se detecta a primeira fase de espera, o que está de acordo com a identificação proposta para os sinais Ni-A e Ni-B e com a hipótese atrás apresentada para a primeira fase de activação da hidrogenase de *D.gigas*.

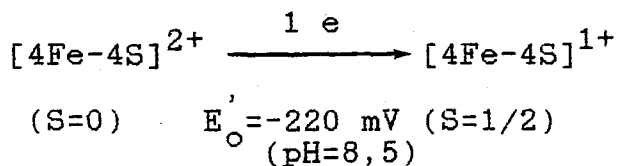
A fracção de enzima isolada consistirá essencialmente numa mistura destas duas formas, ambas inactivas.

V.8.1.2-Estados reduzidos da enzima

As titulações redox seguidas por RPE efectuadas por adição de um redutor químico (ditiotionito de sódio) indicam que os sinais de RPE a $g=2,02$ e a $g=2,31$ desaparecem através de processos redox monoelectrónicos com potenciais de -70 mV e -220 mV (a $pH=8,5$), respectivamente. Este último potencial é dependente do pH, decrescendo 60 mV por cada aumento de uma unidade de pH. Combinando os resultados das espectroscopias de RPE e Mössbauer, pode atribuir-se o processo a -70 mV à redução do centro $[3Fe-xS]_{ox}$



e o processo a -220 mV foi sugerido corresponder à redução de um centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (ver secções anteriores)



Foi referida anteriormente outra hipótese para o desaparecimento do Sinal Ni-A neste processo redox, envolvendo a redução do centro de níquel (transição Ni(III)/Ni(II)). Contudo, não se dispõe ainda de dados suficientes que permitam confirmar ou excluir esta hipótese. Assim, e como hipótese de trabalho, na discussão que se segue considerar-se-á apenas um modelo envolvendo a redução de um centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ associada ao potencial de -220 mV.

A espectroscopia de Mössbauer indica que o centro $[3\text{Fe-xS}]$ permanece na forma reduzida com S=2 a potenciais inferiores a -80 mV, não ocorrendo qualquer interconversão em centros $[4\text{Fe-4S}]$.

Os centros $[3\text{Fe-xS}]_{\text{red}}$ são silenciosos em RPE, pelo menos na região de $g=2$. No entanto, os centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$, em geral com S=1/2, deviam dar origem a um sinal típico com $g_{\text{med}}=1,94$. A não observação deste sinal na maioria das amostras e o desaparecimento dos sinais de RPE Ni-A e Ni-B pode ser explicada por acoplamento magnético do centro $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ com o centro de níquel, de modo a resultar um sistema silencioso em RPE. Este tipo de acoplamento entre centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ e outros centros

paramagnéticos tem sido proposto para diversas enzimas:

- Sulfito reductase de *E. coli* (30)-

Esta enzima é um complexo multienzimático, constituído por quatro monómeros, cada um com um sirohemo, contendo um ião ferro (III) de alto spin, e um agregado $[4Fe4S]^{2+/1+}$ (SiR). Conjugando dados espectroscópicos de Mössbauer e RPE, mostrou-se que estes dois centros estão acoplados magneticamente por um mecanismo de superpermuta através de um ligando comum em ponte. Este acoplamento mantém-se em todos os estados de redução da enzima (SiR^{-1} e SiR^{-2}) pelo que, quando o centro $[4Fe-4S]$ se encontra no estado $1+$, com $S=1/2$, não se observa o sinal de RPE a $g=1,94$. Este sinal é detectado apenas em complexos da enzima com ligandos fortes, como CO e CN^- , que transformam o hemo no estado reduzido em hemo ferroso de baixo spin ($S=0$). No estado totalmente oxidado, o sinal de Mössbauer do centro Fe/S revela propriedades magnéticas, típicas de centros com spin electrónico semi-inteiro, sendo dependente da direcção do campo aplicado, pelo que lhe deveria estar associado um intenso sinal de RPE. Contudo, só é detectado um sinal característico de hemo férrico de alto spin ($S=5/2$), o que indica que ambos os centros estão acoplados, partilhando o spin electrónico $S=5/2$. Nos estados reduzidos observa-se novamente o mesmo tipo de acoplamento. Em relação ao sistema em estudo, é particularmente interessante o caso do complexo de SiR com o ião sulfureto. Nesta situação o hemo é de baixo spin e verifica-se que o primeiro centro a ser reduzido é o agregado Fe/S, formando-se um sistema com $S_h=1/2$ e $S_c=1/2$, silencioso em RPE. Não se observa interacção magnética hiperfina no espectro de

Mössbauer a baixa temperatura, isto é, o espectro consiste apenas na sobreposição de doublets de quadrupolo, indicando que todos os átomos de ferro estão num sistema diamagnético, ou seja, o siro-hemo e o agregado Fe/S estão acoplados. Provou-se assim que o desaparecimento do sinal de RPE do sirohemo férrico, de baixo spin, no estado nativo da enzima, se devia à redução de outro centro metálico a ele acoplado, mantendo-se o seu estado de oxidação. Estudos de dependência do sinal com o campo aplicado confirmaram novamente que o mecanismo de acoplamento é de super-permuta.

Este tipo de acoplamento foi observado também em outras sulfito reductases (*D. vulgaris* (30) e *espinafre* (31)).

- Hidrogenase de *Chromatium vinosum* (20)-

A forma nativa desta hidrogenase consiste numa mistura de diversas formas de hidrogenase:

- formas inactivas, nas quais se observam sinais de RPE de níquel a $g=2,33$, $2,16$ e $2,01$ e a $g=2,31$, $2,23$ e $2,01$ (sinais idênticos aos sinais Ni-B e Ni-A, respectivamente, da hidrogenase de *D. gigas*) e um sinal isotrópico a $g=2,02$, atribuído a um centro $[3Fe-xS]_{ox}$;

- forma activa, em que são detectados sinais de RPE com valores de g dependentes da frequência de microondas. Estes sinais apresentam uma relaxação electrónica mais rápida que os anteriores, revelando-se apenas a baixas temperaturas: sinal quase isotrópico, com valores de $g_{||}=1,97$ e $g_{\perp}=2,0086$, atribuído a um centro $[4Fe-4S]^{3+}$, e com as linhas apresentando um ligeiro desdobramento, e um sinal com valores de g semelhantes aos sinais Ni-A e Ni-

B , também desdobrados em torno dos valores de g destes sinais. A observação deste sinal, revelando interacção entre centros paramagnéticos, foi explicada pelos autores como devido a um acoplamento de permuta entre os centros de Ni(III) e o centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{3+}$. O valor do desdobramento das linhas de RPE levou os autores a postularem uma distância máxima de 1,2 nm entre os dois centros.

- Metilamina desidrogenases (32)-

Estas enzimas contêm grupos FMN e centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/1+}$. Por adição do substrato dá-se uma redução bielectrónica do grupo flavínico, com formação de FMNH_2 , seguida de uma transferência monoelectrónica lenta deste grupo para o centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$. Forma-se então um estado tripleto, por interacção entre FMNH^+ ($S=1/2$) e o centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ ($S=1/2$), originando um sinal de RPE interpretado como resultado deste acoplamento de spin entre ambos os centros paramagnéticos. Por redução com ditionito não se observa o sinal de interacção, o que sugere que a presença do substrato induz uma mudança conformacional necessã spin-spin.

- Xantina oxidase (33)-

Como referido em alíneas anteriores, também nesta enzima parece haver uma interacção de permuta entre centros paramagnéticos, originando o desdobramento das linhas dos sinais de cada centro.

Estes dados tornam plausível a hipótese de acoplamento entre o centro de Ni(III) e o centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ no estado silencioso em RPE atingido com $E'_0 = -220 \text{ mV}$, na hidrogenase de *D.gigas*.

Diversos autores têm referido que para estes tipos de acoplamento serem efectivos é necessário que a distância entre os centros envolvidos seja inferior a 1,2 nm (35,36). Em relação a este ponto é de referir que por EXAFS se detecta um dispersor a cerca de 0,4 nm do centro de níquel na hidrogenase, ainda não identificado. No entanto, não se dispõe ainda de dados que permitam caracterizar quer o tipo de acoplamento quer o spin total dos sistemas acoplados na hidrogenase de *D.gigas*. O facto de se observarem sempre espectros magnéticos de Mössbauer nos estados reduzidos da enzima, para além do espectro do centro $[3\text{Fe-xS}]_{\text{red}}$, embora em geral não se observem sinais de RPE para os centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$, sugere que o spin total do sistema é diferente de $S=0$ ou $S=1/2$. Os vários exemplos acima referidos, bem como os resultados obtidos para diversos estados de redução e complexação da sulfito reductase, indicam que o acoplamento entre sistemas com $S=1/2$ pode dar origem a estados com diversos valores de spin total. Também não se pode excluir a hipótese de os sinais de RPE a $g=1,94$ não serem detectados devido ao facto do spin electrónico total dos agregados $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ ser superior a $1/2$, como observado na proteína Fe da nitrogenase de *A.vinelandii* (15) e nas ferredoxinas com selénio de *C.pasteurianum* (14).

Em relação à activação da enzima, Merge et al (25) verificaram que a enzima depois de activada é desactivada pelo potencial através de um processo monoelectrónico com $E'_0 = -220$ mV a pH=8,5 e Berlier et al (23) mostraram que a activação sob hidrogénio corresponde à redução de centros Fe/S. A comparação destas observações com as evidências espectroscópicas sugere que o estado enzimático silencioso em RPE constitua a forma activa da

enzima, isto é, a forma que pode reagir com H_2 .

Deve referir-se ainda, embora seja um facto ainda não completamente elucidado, que a redução do centro $[3Fe-xS]$ e o desaparecimento do sinal a $g=2,31$ seguem a ordem dos potenciais redox quando se adiciona um redutor químico, mas que na presença do substrato natural, H_2 , esta redução é aproximadamente simultânea. Este facto pode resultar quer de alterações conformacionais na presença do substrato natural, modificando o potencial redox dos centros, como por exemplo se observa na metilamina desidrogenase (32), quer de os estados enzimáticos obtidos corresponderem a estados em que o equilíbrio redox entre todas as moléculas de enzima na amostra não ter sido atingido.

Pode assim caracterizar-se o estado activo da enzima como contendo um centro $[3Fe-xS]$ reduzido, um centro $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ reduzido e magneticamente acoplado ao centro de $Ni(III)$ e um centro $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ oxidado (Diagrama V.3).

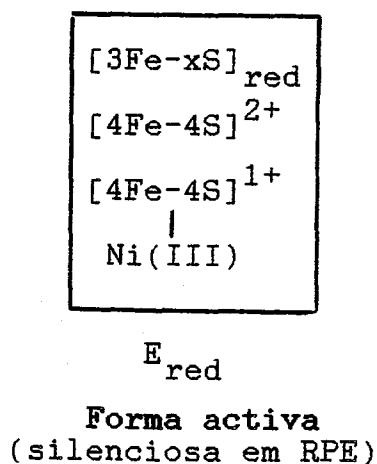


Diagrama V.3: Forma activa da hidrogenase de *D.gigas*

O ciclo de activação poderá então ser traduzido pela sequência de reacções representadas no diagrama V.4.

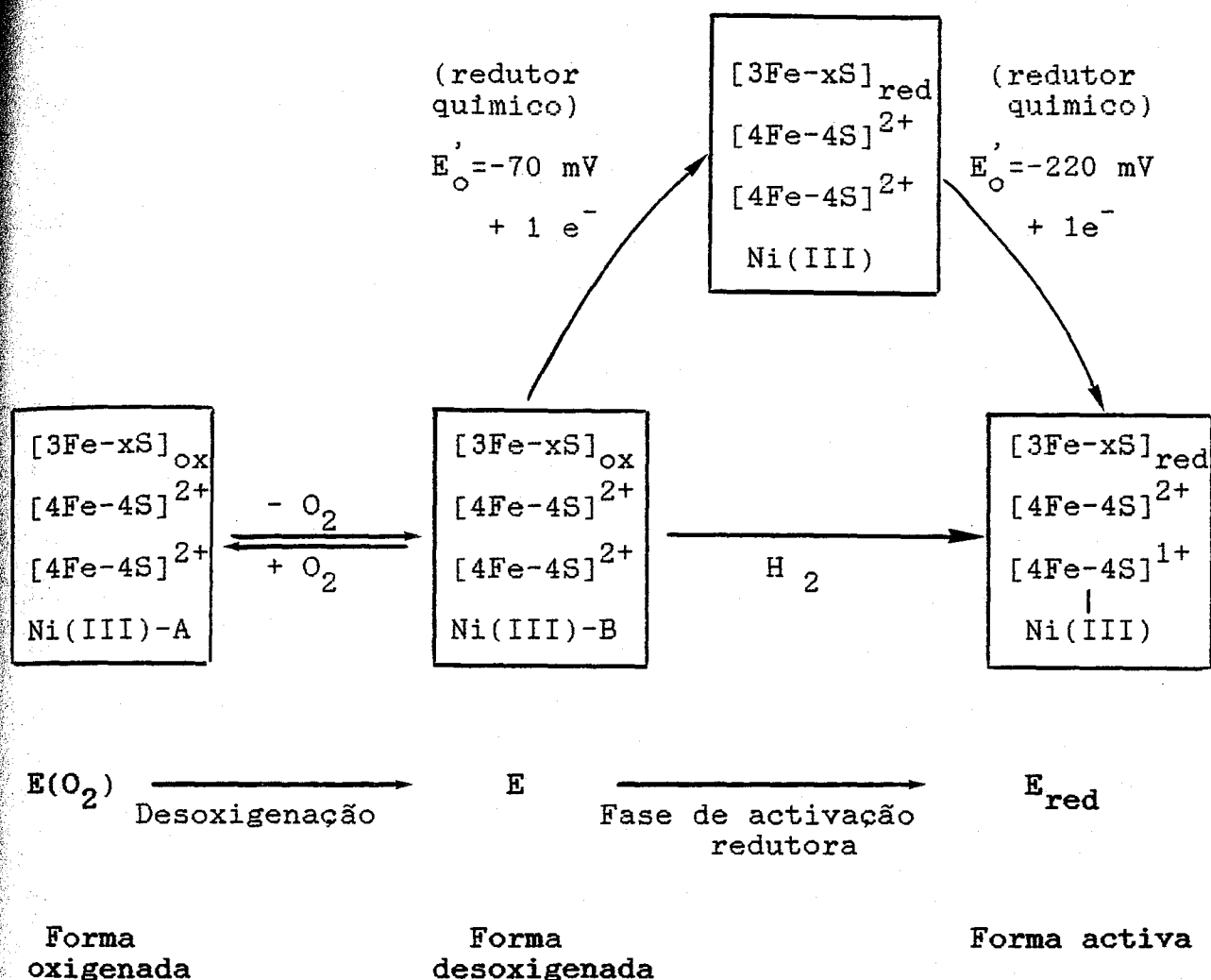


Diagrama V.4: Ciclo de activação da hidrogenase de *D. gigas*

Para que este processo de activação sob hidrogénio seja possível é necessário postular a presença de uma pequena quantidade de hidrogenase activa na fracção nativa.

V.8.2-Ciclo catalítico da hidrogenase de *D. gigas*

O estabelecimento dos varios intermediários do ciclo catalítico é, neste momento, mais difícil. Os dados disponiveis são descritos nas alíneas seguintes.

-Espécies paramagnéticas detectadas por RPE-

Após o estado silencioso em RPE (Forma activa), observa-se a formação dos sinais de RPE a $g=2,19$ (Sinal Ni-C) e a $g=2,21$, por redução da hidrogenase de *D.gigas* sob hidrogénio. Em algumas preparações da enzima observa-se concomitantemente com o sinal a $g=2,19$ um sinal de um centro $[4Fe-4S]^{1+}$ e, nos estados mais reduzidos da enzima, revela-se outro sinal devido a centros $[4Fe-4S]^{1+}$. Estes sinais têm sido detectados apenas em preparações enzimáticas com menor actividade específica (cerca de $90 \text{ mol H}_2.\text{mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), enquanto nas preparações mais activas ($300-400 \text{ mol H}_2.\text{mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) são detectáveis somente os sinais a $g=2,19$ e $2,21$. No entanto, a evidência obtida por espectroscopia de Mössbauer indica que nos estados mais reduzidos da enzima todos os centros $[4Fe-4S]$ estão reduzidos.

O sinal a $g=2,19$ deve-se a um centro de níquel, de acordo com a observação de desdobramento por interacção hiperfina nas linhas do sinal de hidrogenase enriquecida em ^{61}Ni . Sendo uma espécie com $S=1/2$, só pode ser devida a iões Ni(I) ou Ni(III) . A partir dos valores de g deste sinal não é possível distinguir entre estes dois estados de oxidação.

A origem do sinal a $g=2,21$ é ainda desconhecida; a sua forma sugere a existência de interacção magnética entre dois centros paramagnéticos. O facto de as larguras de linha deste sinal não serem afectadas pelo isótopo ^{61}Ni , indica que ele pode resultar de centros $[4Fe-4S]^{1+}$.

-Potenciais redox-

- Lissolo et al (24) mostraram que a activação da enzima sob

hidrogénio está associada a um processo redox monoelectrónico com $E'_O = -350$ mV, a pH=8,5.

- As titulações redox seguidas por RPE revelaram que o sinal a $g=2,19$ se começa a formar a potenciais inferiores a -300 mV, atinge um máximo de intensidade a cerca de -380 e quase desaparece a potenciais inferiores a -400 mV. O sinal a $g=2,21$ tem um comportamento semelhante, embora a potenciais mais negativos- a intensidade máxima é atingida perto de -400 mV e a -430 mV a sua intensidade está reduzida a cerca de 50% do valor máximo. O ajuste teórico de curvas de Nernst a este processo é difícil, particularmente por não ser conhecido com precisão o valor das intensidades máximas de ambos os sinais.

Para a interpretação destes resultados serão discutidos dois modelos, tendo como principal objectivo explicar a forma das curvas de titulação dos estados intermediários, estabelecer os passos de transferência electrónica entre o centro activo e os outros centros enzimáticos, identificar os estados de oxidação do níquel e o centro enzimático onde ocorre a activação da molécula de hidrogénio, discutindo-se a presença de um intermediário hidreto. Começar-se-á por este último ponto.

V.8.2.1-Characterização do intermediário hidreto

Como referido no início desta secção, a ocorrência do mecanismo heterolítico leva a postular a formação de um intermediário enzima-hidreto. A primeira questão que se põe é saber se a activação da molécula de hidrogénio ocorre num centro Fe/S ou no centro de níquel. Diversos factores levam a preferir a segunda hipótese.

- Nas reacções de hidrogenação catalítica de hidrocarbonetos, que se supõe envolver complexos hidreto como a espécie cataliticamente activa, os complexos de níquel têm-se revelado extremamente eficientes, ou seja, o níquel é um metal que apresenta elevada reactividade em relação ao hidrogénio molecular;
- São conhecidos hidretos de níquel estáveis, em geral em complexos com ligandos aceitadores de electrões, como é o caso de ligandos coordenados através de átomos de enxofre;
- A activação da molécula de hidrogénio pela hidrogenase ocorre pelo mecanismo heterolítico. Como foi referido no capítulo IV, este modo de activação é comum em metais como o níquel, bem como nos sistemas modelo referidos no Capítulo II;
- Os centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/1+}$ e $[3\text{Fe}-x\text{S}]$ presentes nas ferredoxinas bacterianas não possuem actividade catalítica própria em relação a qualquer substrato e, em particular, ao hidrogénio molecular. Os agregados deste tipo caracterizados na hidrogenase de *D.gigas* são idênticos a estes centros, pelo que não parece plausível a sua reactividade com H_2 . Nas hidrogenase contendo apenas centros Fe/S (hidrogenases de *D.vulgaris* e *C.pasteurianum*), pelo menos um dos centros Fe/S apresenta características espectroscópicas invulgares, o qual poderá corresponder à espécie cataliticamente activa. Este tipo de centro não tem sido observado nas hidrogenases $[\text{NiFe}]$. Assim, os centros Fe/S destas hidrogenases poderão estar limitados apenas a reacções de transferência electrónica intra ou intermoleculares.

Quanto aos sinais de RPE detectados no estado reduzido da enzima, algumas evidências experimentais parecem apontar para que o sinal a $g=2,19$ (Sinal de Ni-C) corresponda ao intermediário

hidreto:

- as larguras de linha do sinal são ligeiramente menores em D_2O que em H_2O , o que é compatível com esta hipótese;
- Albracht et al (36) estudaram a transformação do sinal a $g=2,19$ da hidrogenase de *Ch.vinosum* por acção da luz em soluções de H_2O e D_2O . Por irradiação a cerca de 20 K, o sinal é totalmente transformado em outro sinal com valores de g a 2,28 , 2,05 e 2,0; esta transformação é irreversível a temperaturas inferiores a 77 K, mas completamente reversível quando a amostra depois de irradiada é aquecida no escuro até 200 K. Em D_2O a velocidade inicial de transformação do sinal a $g=2,19$ por irradiação, estudada para diversas intensidades de radiação, é aproximadamente 18 % da velocidade observada em H_2O . Este efeito levou os autores a proporem que a ligação sensível à luz seja uma ligação directa Ni-H. Além deste efeito, foi também observada uma diminuição de cerca de 0,5 mT na largura de linha do sinal a $g=2,19$ desta hidrogenase em D_2O , indicando novamente que a interacção hiperfina de níquel com protões contribui para a largura de linha do sinal. Os autores detectaram efeitos semelhantes na hidrogenase de *Vibrio succinogenes*. A semelhança dos sinais de RPE de níquel detectados nas hidrogenases de *D.gigas* e *Ch.vinosum* nos estados nativo e reduzidos de ambas as enzimas sugere que os centros de níquel de ambas as hidrogenases são semelhantes, o que permite extrapolar os resultados obtidos para a hidrogenase de *Ch.vinosum* para a hidrogenase de *D.gigas*.
- Por último, os estudos de actividade catalítica realizados por Lissolo et al (24), revelaram que a activação da hidrogenase de *D.gigas* ocorre a potenciais semelhantes aos associados ao apare-

cimento do signal Ni-C, pelo que a espécie associada a este sinal deve representar um intermediário do ciclo catalítico.

Estes resultados sugerem que o sinal a $g=2,19$ representa, de facto, um complexo $Ni-H^-$. A discussão que se segue partirá deste pressuposto.

O passo final da oxidação de H_2 consistirá na dissociação do complexo hidreto,



ou seja, pode envolver um passo de redução bieletrónico. Embora estes electrões sejam possivelmente transferidos para outros centros enzimáticos, intermediários entre o centro activo e os aceitantes exógenos, *in vivo*, não é provável que estes dois passos de transferência electrónica ocorram em simultâneo. Esta transferência seria possível se ocorresse por transferência de ligando ou se o centro metálico for de facto um complexo heteronuclear em que o ião níquel e iões ferro de centros $[4Fe-4S]$ se encontram numa estrutura electrónica deslocalizada. Contudo, para o sinal a $g=2,19$ não se detecta alargamento das linhas na presença de ^{57}Fe , o que, pelo menos em parte, contraria esta hipótese, levando a considerar a existência de um passo de transferência bieletrónica no ciclo catalítico.

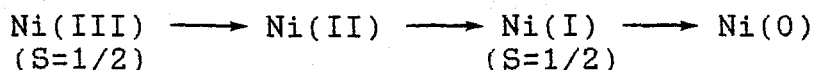
V.8.2.2 Modelos para o ciclo catalítico

Os modelos que serão considerados resumem-se na Tabela V.10.

Modelo I: $Ni(III) \rightarrow Ni(0)$

Um modo possível de interpretar a sequência de sinais de

RPE de níquel observada por redução da hidrogenase de *D.gigas* sob hidrogénio é supor que ocorrem reduções sucessivas do centro de níquel, presente no estado nativo da enzima no estado Ni(III), até ao estado Ni(0) na forma mais reduzida da enzima.



No estado oxidado da enzima, não activo, os sinais de RPE Ni-A e Ni-B corresponderiam a um ião Ni(III), com $S=1/2$, em conformações diferentes (ver secção anterior). O primeiro estado silencioso em RPE, atingido com $E'_0 = -220$ mV (pH=8,5), estaria associado à redução de Ni(III) a Ni(II); este ião, em geral com $S=0$, não é activo em RPE. Uma nova redução deste centro levaria à formação de um ião Ni(I) ($S=1/2$), eventualmente um complexo hidreto Ni(I)-H, correspondendo ao sinal a $g="2,19"$. No estado final de redução da enzima, novamente silencioso em RPE, o ião níquel seria reduzido a Ni(0) (sistema d^{10} , com $S=0$, e por isso não activo em RPE).

Porém, os dados obtidos para a hidrogenase de *D.gigas* e, como se verá adiante, para as hidrogenases de outras bactérias redutoras de sulfato, não parecem compatíveis com esta hipótese, devido essencialmente aos seguintes pontos:

- O primeiro estado silencioso em RPE, de acordo com os dados de espectroscopia de Mössbauer, resulta de um acoplamento entre um centro $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ ($S=1/2$) e outro centro paramagnético, possivelmente Ni(III) ($S=1/2$);
- O aparecimento do sinal a $g=2,19$ poderia resultar de uma redução bielectrónica Ni(III)-Ni(I), na presença de hidrogénio. Mas, neste caso, este sinal não corresponderia à presença de um

**TABELA V.10: Estados de oxidação do níquel
na hidrogenase de *D.gigas***

Estados da enzima e sinais de RPE de níquel	<u>Modelo I</u>	<u>Modelo II</u>
Estado Oxidado		
<u>Sinais Ni-A, Ni-B</u>	Ni(III)	Ni(III)
g= 2,31 2,23 2,02		
g= 2,33 2,16 2,01		
Estado activo (Silencioso em RPE)	Ni(II)	Ni(III) (acoplado)
Intermediário hidreto		
<u>Sinal Ni-C</u>	Ni(I)-H	Ni(III)-H
g=2,19 2,14 2,02		
Estado reduzido	Ni(0)	Ni(II)

complexo Ni(I)-H. O sinal a g=2,21 não poderia também, nesta situação, corresponder a uma espécie de níquel, mesmo acoplada magneticamente a outro centro, pois o ião Ni(0) tem S=0, o que limitaria aquele sinal a centros Fe/S.

- O passo final do ciclo catalítico deve envolver uma reacção bielectrónica, provavelmente a partir da espécie associada ao sinal de RPE a g=2,19, o que contraria novamente este esquema.

Os dados de química do níquel levam a preferir um ciclo catalítico que envolva um menor número de estados de oxidação do níquel. Em particular, o estado Ni(0) é altamente reactivo, com potenciais redox para a transição Ni(I)/Ni(0) da ordem dos -2 V, valor muito afastado dos valores de -350 a -400 mV observados para as transições na hidrogenase de *D.gigas*. Além disso, em geral uma dada coordenação do ião níquel não estabiliza simultaneamente os estados de oxidação superiores ou inferiores a

Ni(II), tendo mesmo sido observada uma relação inversa de potenciais redox para as transições Ni(III)/Ni(II) e Ni(II)/Ni(I) para complexos de níquel com ligandos macrocíclicos (Capítulo II).

Modelo II: Ni(III)/Ni(II)

Este modelo resulta essencialmente das considerações anteriores, numa tentativa de reduzir ao mínimo o número de estados de oxidação do níquel envolvidos no ciclo catalítico. Foi proposto como uma hipótese de trabalho (38), numa tentativa de reunir todas as informações de que então se dispunha. Os dados entretanto adquiridos permitem uma extensão deste modelo. Utilizar-se-á também como base deste modelo o ciclo catalítico de produção de hidrogénio apresentado por Alvarez e Hoffman (39), referido no Capítulo II, o qual, por facilidade de discussão, se apresenta de novo na figura V.44.

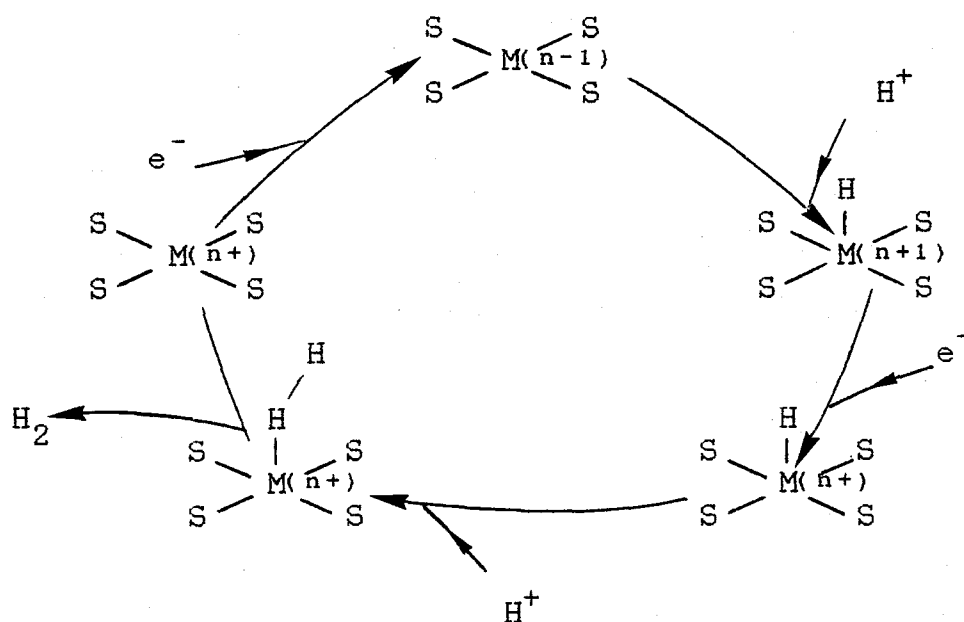
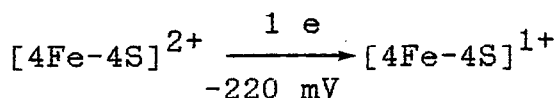


Figura V.44: Esquema catalítico para a produção de hidrogénio a partir de ditiolenos de níquel (39)

Para além da demonstração teórica da possibilidade de um ião Ni(III) formar complexos hidreto, este esquema evidencia a necessidade de ocorrer uma transição bielectrónica Ni(IV)/Ni(III) associada à dissociação ou ligação do protão do centro de níquel, e mostra um possível mecanismo para a eliminação da molécula de hidrogénio.

-Estado activo: A redução a $E'_0 = -220$ mV (pH=8,5) é atribuída à transição



O estado silencioso em RPE formado após esta transição, ou seja, a não observação dos sinais de Ni(III) presentes no estado nativo, pode ser explicado postulando o acoplamento magnético entre o centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ e o ião Ni(III), resultando num sistema não detectável em RPE. Este tipo de acoplamento tem sido observado em diversas enzimas (ver secção anterior), parecendo resultar de processos de superpermuta através de um ligando em ponte, comum a ambos os centros paramagnéticos.

Esta hipótese leva à definição de uma nova unidade funcional em metaloenzimas- um centro heteronuclear contendo um ião Ni(III) e um agregado $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$, presente no estado activo da enzima e responsável pela activação de hidrogénio em hidrogenases do tipo [NiFe] (ver discussão no capítulo X).

O potencial redox atribuído à redução do centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ (-220 mV) tem um valor mais elevado que o geralmente encontrado para este tipo de centros. Esta diferença, de acordo com o modelo proposto, poderia resultar da formação desta unidade funcional, que estabilizaria o estado $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$.

- Activação da molécula de hidrogénio : Por ligação da molécula de hidrogénio, e de acordo com o mecanismo de cisão heterolítica, forma-se um ião hidreto. O sítio de ligação deste ião seria o centro de níquel, formando-se um ião Ni(III)-H, correspondendo ao sinal de RPE a $g=2,19$. O acoplamento entre o centro de níquel e o centro $[4Fe-4S]^{1+}$ é quebrado, resultando na observação do sinal de RPE de níquel.

O protão resultante da cisão heterolítica deverá ser estabilizado por uma base na vizinhança daqueles centros. Várias hipóteses podem ser consideradas: ligação a um grupo ionizável da cadeia polipeptídica; ligação a um ligando do ião Ni(III), tal como é proposto para o sistema modelo Pd(salen), acompanhada da quebra da ligação deste ligando ao ião níquel; ligação ao hipotético ligando em ponte entre os centros de níquel e $[4Fe-4S]^{1+}$, ou mesmo a este agregado, quebrando assim o acoplamento entre estes centros.

Em qualquer dos casos, a quebra de acoplamento explicaria a observação, em algumas amostras, de um sinal de RPE típico de centros $[4Fe-4S]^{1+}$ com $S=1/2$ (sinal a $g=1,94$), em simultâneo com o sinal de níquel a $g=2,19$. Contudo, é necessário explicar o não aparecimento destes sinais na maioria das amostras da hidrogenase de *D. gigas*. Este facto pode resultar quer de o centro $[4Fe-4S]^{1+}$ se manter acoplado a outro centro paramagnético, quer de propriedades electrónicas particulares (estado de spin e velocidade de relaxação). De acordo com o modelo considerado, neste estado da enzima apenas existem mais dois centros paramagnéticos com os quais seria possível o acoplamento: o centro de níquel (III) e o centro $[3Fe-xS]_{red}$. A observação de desdobramento a

baixa temperatura do sinal de níquel a $g=2,28$, considerando a explicação proposta por Albracht *et al* (37) para a origem deste sinal (quebra da ligação $Ni(I)-H$), pode indicar que os centros de $Ni(III)$ e $[4Fe-4S]^{1+}$ se mantêm numa conformação em que o acoplamento entre estes dois centros é possível. Nesta situação, a proximidade do centro de níquel poderia alterar significativamente as propriedades de relaxação do centro $[4Fe-4S]^{1+}$, tornando-o não detectável em RPE. Por outro lado, os dados disponíveis não permitem excluir a hipótese de o centro $[3Fe-xS]_{red}$ estar acoplado ao centro $[4Fe-4S]^{1+}$ (por exemplo, Johnson *et al* (19) propuseram que o facto de o sinal de RPE a $g=12$, atribuído ao centro $[3Fe-xS]_{red}$, não ser observado em alguns estados de redução da enzima, poderia resultar do acoplamento deste centro a outro paramagneto).

Por ultimo, é de referir que recentemente têm sido detectados estados de spin semi-inteiros, superiores a $1/2$, para centros $[4Fe-4S]^{1+}$, resultando em sistemas em que não se observa o sinal de RPE típico destes centros com $S=1/2$ a $g=1,94$. Estes estados de spin são bastante sensíveis à conformação da proteína, podendo ser interconvertidos por acção de agentes externos (por exemplo, ureia) (15). Contudo, nestes casos têm sido encontrados sinais de RPE a campo baixo (região de $g=3$ e $g=5$), de fraca intensidade, que não foram ainda observados para a hidrogenase de *D.gigas*.

-Redução dos centros enzimáticos: Os passos seguintes do ciclo catalítico serão a redução do centro de níquel e do centro $[4Fe-$

$[4S]^{2+}$, envolvendo a dissociação do complexo hidreto e uma redução bieletrônica do íon níquel. Utilizando o modelo de Alvarez e Hoffman (39), propõe-se a seguinte hipótese:

- o segundo centro $[4Fe-4S]^{2+}$ oxida o complexo $Ni(III)-H$, formando-se um intermediário altamente reactivo $Ni(IV)-H$ o qual, rapidamente, se dissociaria, formando um íon $Ni(II)$ e libertando um próton. Esta hipótese leva a considerar a formação de um estado de oxidação instável do níquel, $Ni(IV)$, cujo potencial de redução é, em geral, bastante positivo. Porém, são conhecidos exemplos de complexos de $Ni(IV)$ com potenciais de redução da mesma ordem de grandeza dos potenciais para a redução $Ni(III)/Ni(II)$ (40). Por outro lado, e tal como já foi referido, a coordenação do centro de níquel é certamente bastante peculiar, atendendo à estabilização pouco usual do íon $Ni(III)$ na hidrogenase em relação aos complexos deste íon. A proximidade dos centros $[4Fe-4S]^{1+}$ pode também contribuir para a estabilização do intermediário de $Ni(IV)$, para além de uma possível contribuição dos ligandos do íon $Ni(IV)$ na estabilização da carga deste íon.

O novo centro $[4Fe-4S]^{1+}$ poderia estar acoplado ao outro centro $[4Fe-4S]^{1+}$, originando o sinal de RPE complexo observado a baixa temperatura em algumas amostras da hidrogenase de *D. gigas*.

A sequência reaccional do ciclo catalítico de consumo de hidrogénio seria assim traduzida pelo diagrama V.5.

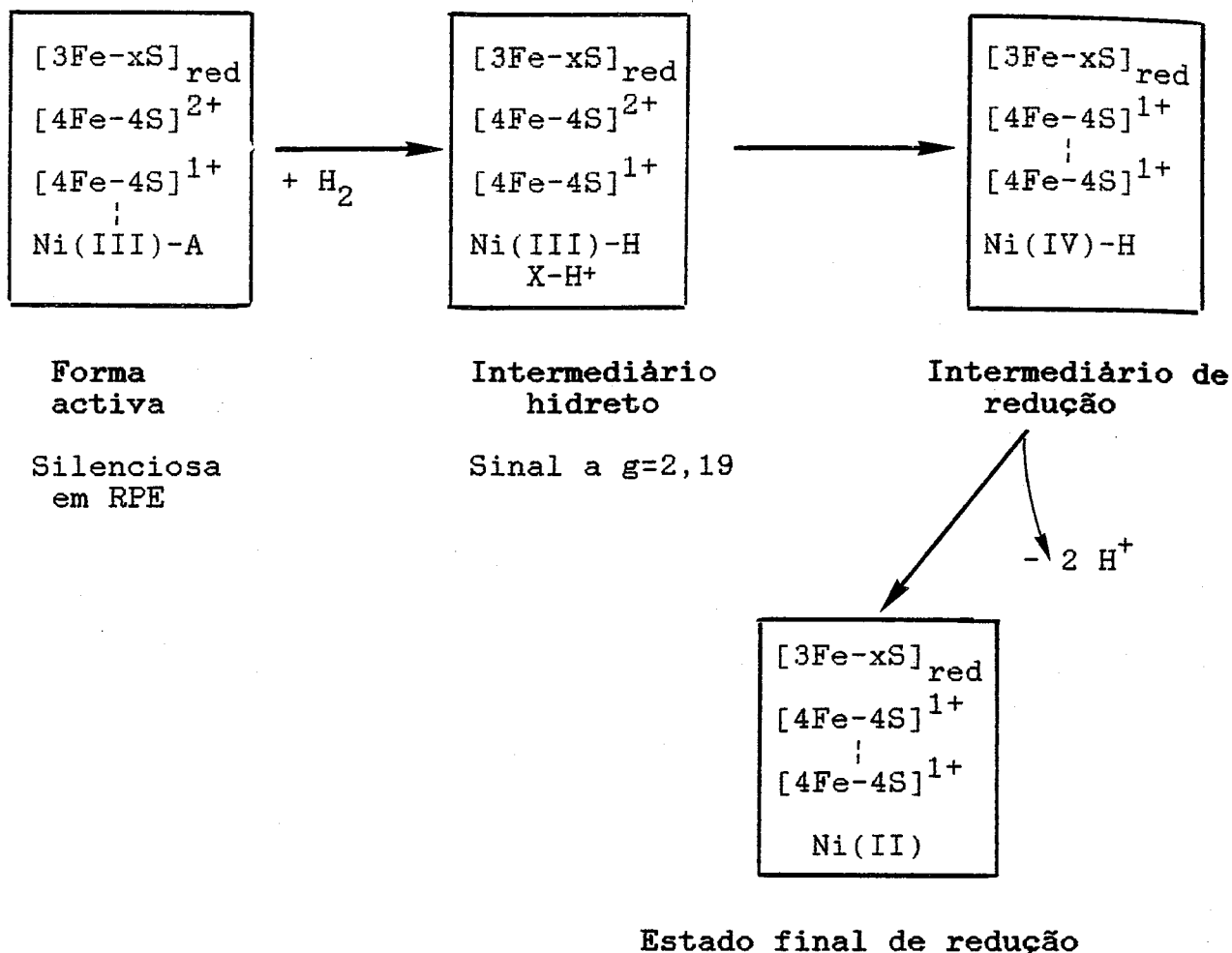


Diagrama V.5: Ciclo catalítico de consumo de hidrogénio pela hidrogenase de *D. gigas*

Contudo, numerosos factos ficam ainda por explicar por este modelo, nomeadamente:

- O aparecimento do sinal a $g=2,19$ está associado a um processo redox com $E'_0 < -350 \text{ mV}$. Os dados disponíveis não permitem explicar o processo envolvido nesta reacção de oxidação/redução, bem como a forma da curva de titulação deste sinal. O seu desaparecimento ocorre a potenciais inferiores a -400 mV . De acordo com este modelo, esta transição pode estar associada à redução do centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, que teria um potencial de redução inferior a -400 mV ,

um valor semelhante ao geralmente encontrado para estes centros.

- O sinal a $g=2,21$ tem um comportamento redox semelhante ao do sinal a $g=2,19$, embora a potenciais ligeiramente inferiores. O não alargamento das linhas deste sinal com ^{61}Ni sugere que o sinal pode ser devido apenas a centros $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$, magnéticamente acoplados.

Uma elucidação definitiva do ciclo catalítico necessita, pois, da clarificação inequívoca de diversos pontos:

- origem dos sinais de RPE a $g=2,19$, a $g=2,21$ e a $g=2,28$, e quais os processos redox associados a estes sinais;
- determinação do estado de oxidação do níquel nos vários estados enzimáticos;
- determinação do estado spin dos centros $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ nos vários estados da enzima e estudo detalhado dos processos de acoplamento magnético;
- origem do sinal isotrópico a $g=2,0$, do tipo observado em radicais, detectado em certos estados de redução da enzima.

V.9-Referências

- 1) E.C.Hatchikian, M.Bruschi and J.LeGall, (1978), Biochem. Biophys. Res.Comm., 82, 451-461
- 2) G.R.Bell, J.LeGall and H.D.Peck, Jr., (1974), J.Bacteriol., 120, 994-997
- 3) J.LeGall, P.O.Ljungdahl, I.Moura, H.D.Peck,Jr., A.V.Xavier, J.J.G.Moura, M.Teixeira, B.H.Huynh and D.V.DerVartanian, (1982), Biochem.Biophys.res.Comm., 106, 610-616
- 4) J.J.G.Moura, I.Moura, B.H.Huynh, H.-J.Krüger, M.Teixeira, R.C.DuVarney, D.V.DerVartanian, A.V.Xavier, H.D.Peck, Jr. and

- J.LeGall, (1982), Biochem.Biophys.Res.Comm., 108, 1388-1393
- 5) M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, D.V.DerVartanian, J.LeGall, H.D.Peck, Jr., B.H.Huynh and J.J.G.Moura, (1983), Eur.J.Biochem., 130, 481-484
- 6) B.H.Huynh, J.J.G.Moura, I.Moura, T.A.Kent, J.LeGall, A.V. Xavier and E.Münck, (1980), J.Biol.Chem., 255, 3242-3244
- 7) P.Middleton, D.P.E.Dickson, C.E.Johnson and J.D.Rush, (1980), Eur.J.Biochem., 104, 289-296
- 8) H.-J.Krüger, B.H.Huynh, P.O.Ljungdahl, A.V.Xavier, D.V.DerVartanian, I.Moura, H.D.Peck, Jr., M.Teixeira, J.J.G.Moura and J.LeGall, (1982), J.Biol.Chem., 257, 14620-14623
- 9) B.H.Huynh, D.S.Patil, M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, J.J.G.Moura, D.V.DerVartanian, H.D.Peck, Jr. and J.LeGall, (1986), submetido a J.Biol.Chem.
- 10) M.H.Emptage, T.A.Kent, B.H.Huynh, J.Rawlings, W.H.Orme-Johnson and E.Münck, (1980), J.Biol.Chem., 255, 1793-1796
- 11) J.R.Lancaster, (1980), FEBS Lett., 536, 165-169
- 12) J.R.Lancaster, (1982), Science, 216, 1324-1325
- 13) H.Rupp and A.L.Moore, (1979), Biochim.Biophys.Acta, 548, 16-29
- 14) M.Moulis, P.Auric., J.Gaillard and J.Meyer, (1984), J.Biol.Chem., 259, 11398-11462
- 15) P.A.Lindahl, P.E.Day, T.A.Kent, W.H.Orme-Johnson and E.Münck, (1985), J.Biol.Chem.,
- 16) R.Mathews, S.Charlton, R.H.Sands and G.Palmer, (1975), J.Biol.Chem., 249, 4326-4328
- 17) R.Cammack, D.S.Patil and E.C.Hatchikian, (1982), FEBS Lett., 142, 289-292

- 18) W.R.Hagen, W.R.Dunham, M.K.Johnson and J.A.Fee, (1985), *Biochim.Biophys.Acta*, 828, 369-374
- 19) M.K.Johnson, I.C.Zambrano, M.H.Czechowski, H.D.Peck, Jr., D.V.DerVartanian and J.LeGall, (1986), in "Frontiers in Bioinorganic chemistry", ed. A.V.Xavier, VCH, pp. 36-44
- 20) S.P.J.Albracht, J.W.der Zwaan and R.D.Fontjin, (1984), *Biochim.Biophys.Acta*, 766, 245-258
- 21) D.J.Lowe, R.M.Lynden-Bell and R.C.Bray, (1972), *Biochem.J.*, 130, 239-249
- 22) G.N.George, (1984), in "Flavins and Flavoproteins", ed. R.C.Bray, R.C.Engel and S.G.Mayhew, Valter de Guyt, Germany, pp. 325-330
- 23) Y.M.Berlier, G.Fauque, P.A.Lespinat and J.LeGall, (1982), *FEBS Lett.*, 140, 185-188
- 24) T.Lissolo, S.Pulvin and D.Thomas, (1984), *J.Biol.Chem.*, 259, 11725-11729
- 25) R.M.Mege and C.Bourdillon, (1986), *Biochim.Biophys.Acta*, in press
- 26) A.Scott, S.Wallin, M.Czechowski, D.V.DerVartanian, J.LeGall, H.D.Peck, Jr. and I.Moura, (1984), *J.Am.Chem.Soc.*, 106, 6864-6865
- 27) A.G.Lappin, C.K.Murray and D.W.Margerum, (1978), *Inorg.Chem.*, 17, 1630-1634
- 28) F.Lovecchio, E.Gore and D.Busch, (1979), *J.Am.Chem.Soc.*, 96, 3109-3117
- 29) D.V.DerVartanian, H.J.Krüger, H.D.Peck, Jr and J.LeGall, (1985), *Rev.Port.Quim.*, 27, 70-73
- 30) J.A.Christner, E.Münck, P.A.Janick and L.M.Siegel, (1983), *J.Biol.Chem.*, 258, 11147-11156

- 31) B.H.huynh, L.Kang, D.V.DerVartanian, H.D.Peck, Jr. and J.LeGall, (1985), J.Biol.Chem.,
- 32) P.A.Janick and L.M.Siegel, (1982), Biochemistry, 21, 3538-3547
- 33) R.C.Stevenson, W.R.Dunham,R.H.Sands, T.P.Singer and H.Beinert, (1986), Biochim.Biophys.Acta, 869, 81-88
- 34) D.J.Lowe and R.C.Bray, (1978), Biochem.J., 169, 471-479
- 35) R.E.Coffman and G.R.Buetten, (1979), J.Phys.Chem., 83, 2392-2400
- 36) R.E.Coffman and G.R.Buetten, (1979), J.Phys.Chem., 83, 2387-2392
- 37) J.W.van der Zwaan, S.P.J.Albracht and R.D.Fontijn, (1985), FEBS Lett., 179, 271-277
- 38) M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, B.H.Huynh, D.V.DerVartanian, H.D.Peck, Jr., J.LeGall and J.J.G.Moura, (1985), J.Biol.Chem., 260, 8942-8950
- 39) S.Alvarez and R.Hoffman, (1986), in press
- 40) W.Levason and C.A.McAuliffe, (1974), Coord.Chem.Rev., 12, 151-184

CAPITULO VI:
HIDROGENASE DE
DESULFOVIBRIO BACULATUS

A bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio baculatus*, estirpe 9974 (DSM 1743) foi isolada de uma cultura bacteriana mista designada por *Chloropseudomonas ethilica* (1). Esta estirpe foi inicialmente designada por *Desulfovibrio ethylica*. Apresenta diversas características semelhantes a *Desulfovibrio desulfuricans* (estirpe Norway 4), nomeadamente em relação às propriedades das ferredoxinas, citocromo c_3 tetrahémico, sulfito reductase (desulforubidina) e hidrogenases (1-4 e este trabalho).

Foram isoladas três formas diferentes de hidrogenase de *D.baculatus*, possivelmente com diferente localização celular: periplasma, citoplasma e membrana. A caracterização espectroscópica (RPE) e catalítica preliminar é descrita neste capítulo.

VI.1-Métodos de purificação das hidrogenases de *D.baculatus*

As células de *D.baculatus* (estirpe 9974, DSM 1743) foram crescidas no meio padrão de lactato-sulfato (5) . A purificação foi realizada aerobicamente. Como se pretendia estudar a compartimentação celular das hidrogenases, prepararam-se diversos extractos brutos.

VI.1.1-Fracção Periplásmica

Utilizou-se um método de purificação análogo ao descrito no capítulo anterior para a extracção dos componentes periplasmáticos deste organismo. Suspenderam-se 700 g de células em 500 ml de Tris/HCl 50 mM, homogeneizando-se a suspensão com o agitador magnético. Centrifugou-se a solução a 20.000 rpm durante 50 min, recolhendo-se a solução sobrenadante. A extracção foi repe-

tida mais uma vez, congelando-se de seguida as células e combinando-se as soluções sobrenadantes de ambas as extracções. Esta solução foi concentrada por ultrafiltração num Diaflo (Amicon), usando-se uma membrana YM-30, até 420 ml. Diluiu-se esta fracção até 600 ml e adsorveu-se numa coluna de DEAE-BioGel A (5x28 cm) previamente equilibrada com Tris/HCl 10 mM. Aplicou-se um gradiente contínuo de Tris/HCl 10 mM - 400 mM (750 ml de cada). A fracção contendo hidrogenase foi recolhida num volume total de 300 ml a uma força iónica próxima de 200 mM e dialisada durante 12 h. Carregou-se esta fracção numa outra coluna de DEAE-BioGel A (3,5x32 cm) equilibrada em Tris/HCl 10 mM e iniciou-se um gradiente linear deste tampão 10 - 400 mM. A hidrogenase foi obtida num volume total de 190 ml e aplicada numa coluna de hidroxilapatite (3,5x15 cm) equilibrada em Tris/HCl 250 mM. A coluna foi lavada sucessivamente com 100 ml de soluções tampão de Tris/HCl com as seguintes molaridades: 250 , 200 , 100 e 10 mM. Iniciou-se então um gradiente contínuo de tampão fosfato 1 mM - 500 mM (500 ml de cada). A fracção de hidrogenase foi recolhida em 150 ml de solução, dialisada e carregada numa terceira coluna de DEAE-BioGel A (3,5x32 cm) equilibrada em Tris/HCl 10 mM. Realizou-se um gradiente contínuo de Tris/HCl (500 ml 10 mM e 500 ml 400 mM). A fracção principal de hidrogenase apresentava uma razão de absorvâncias A_{390}/A_{280} de 0,28 e uma actividade específica de 530 $\mu\text{mol H}_2 \text{ produzido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

VI.1.2-Fracções membranar e solúvel

Foram suspensas 740 g de células em 500 ml de Tris/HCl 50 mM, que se partiram passando duas vezes numa "French Press" a

9.000 lb.m⁻². Adicionaram-se alguns miligramas de DNase e o extracto bruto foi obtido por centrifugação a 20.000 rpm durante 40 min. A fracção particular foi resuspendida em 60 ml de Tris/HCl 50 mM. Obtiveram-se assim duas fracções contendo , respectivamente, hidrogenase solúvel e membranas.

i) Fracção solúvel

O extracto bruto (1560 ml) foi adsorvido numa coluna de DEAE-52 (5x56 cm) equilibrada com Tris/HCl 10 mM. Iniciou-se um gradiente continuo de Tris/HCl 10 mM-500 mM (1000 ml de cada). A fracção contendo hidrogenase (300 ml) foi recolhida a uma força iónica de cerca de 200 mM, dialisada durante 12 h e carregada numa coluna de DEAE-BioGel A (3,5x32 cm) equilibrada em Tris/HCl 10 mM. Aplicou-se um gradiente continuo de Tris/HCl (500 ml 10 mM e 500 ml 400 mM). A hidrogenase recolheu-se numa fracção com o volume de 200 ml. Após nova diálise, esta fracção foi adsorvida numa segunda coluna de DEAE-BioGel (3,5x40 cm) equilibrada em Tris/HCl 10 mM. Esta coluna foi eluida com um gradiente continuo de Tris/HCl 10 mM-400 mM (500 ml de cada). A fracção contendo hidrogenase, com um volume de 125 ml, foi dialisada e carregada numa terceira coluna de DEAE-BioGel A (3.5x30 cm), equilibrada em Tris/HCl 10 mM. Por eluição com um gradiente continuo daquele tampão (500 ml 10mM - 500 ml 400 mM) obteve-se uma fracção contendo hidrogenase pura com uma razão de absorvâncias A_{390}/A_{280} e 0,25 e uma actividade especifica de 467 $\mu\text{mol H}_2 \text{ produzido.min}^{-1} \text{ .mg}^{-1}$.

1) Fracção Membranar

Solubilização da hidrogenase - O precipitado em suspensão foi sonificado duas vezes durante 3 min na presença de deoxicolato de sódio (1,5 % p/v). A fracção sonificada foi centrifugada 1 h a 20.000 rpm, dialisada e centrifugada novamente 1,5 h a 20.000 rpm. A fracção contendo a hidrogenase solubilizada (70 ml) adicionou-se pancreatina (1 mg/ 10 mg de hidrogenase) e incubou-se a mistura a 50 °C durante 50 min. Em seguida centrifugou-se a mistura a 20000 rpm por 1 h e recolheu-se a solução sobrenadante contendo a hidrogenase solubilizada.

Purificação - A fracção de hidrogenase foi diluída até 100 ml e adsorvida numa coluna de DEAE-BioGel A (3,5x32 cm) equilibrada com Tris/HCl 10 mM. Por eluição com um gradiente linear de Tris/HCl 10 mM-300 mM (500 ml de cada) obteve-se uma fracção contendo hidrogenase e citocromos (200 ml). Esta fracção foi diluída duas vezes e carregada numa segunda coluna de DEAE-BioGel A (3,5x35 cm) equilibrada com Tris/HCl 10 mM. Aplicou-se um gradiente contínuo de Tris/HCl (500 ml 10 mM e 500 ml 400 mM). Recolheram-se duas bandas contendo actividade hidrogenase. A fracção menos acidica - Hidrogenase membranar I- tinha uma razão de absorvâncias A_{390}/A_{280} de 0,1 e uma actividade especifica de 47 $\mu\text{mol H}_2 \text{ produzido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. A fracção mais acidica - Hidrogenase membranar II- foi obtida com uma razão de absorvâncias A_{390}/A_{280} de 0,14 e uma actividade especifica de 121 $\mu\text{mol H}_2 \text{ produzido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Estas duas fracções de hidrogenase apresentam características fisico-químicas muito semelhantes, pelo que nas alíneas seguintes não se fará uma distinção de ambas as fracções.

VI.2-*Caracterização Fisico-Química*

VI.2.1-Massa Molecular

As massas moleculares das hidrogenases de *D.baculatus* foram determinadas por filtração em gel por HPLC, obtendo-se para todas as formas da enzima um valor de 100 ± 10 kDa. A massa molecular das subunidades foi determinada por electroforese em geis de poliacrilamida na presença de SDS (Tabela VI.1).

**TABELA VI.1:Massa Molecular das
Hidrogenases de *D.baculatus***

Fracção	Massa Molecular (kDa)		
	Subunidade	Total ^(a)	
Citoplásmica	54,0 ; 27,0	81	(100)
Periplásmica	49,0 ; 26,0	75	(110)
Membranar	62,0 ; 27,0	89	(100)

(a) Os valores entre () foram determinados por HPLC

VI.2.2-Análise química

O conteúdo em metais destas hidrogenases foi analisado por espectrometria de Emissão de Plasma. Os valores obtidos encontram-se na tabela VI.2 . Verificou-se que, para além de ferro não hémico, estas hidrogenases contêm níquel e selênio em quantidades equimolares. O conteúdo em níquel e selênio nestas enzimas, particularmente nas solúveis, é inferior a uma átomo-g por mole de enzima, o que pode resultar quer de as fracções isoladas conterem apo-proteína, quer de uma parcial desnaturação da enzima. Entre parêntesis, mostram-se na Tabela VI.2 valores de con-

teúdo em metais supondo que cada molécula de enzima contém um átomo de níquel.

TABELA VI.2: Conteúdo em metais e selênio das hidrogenases de *D.baculatus*

Enzima	Fe	Ni	Se
Citoplásmica	7,7 (14,1)	0,54 (1)	0,56 (1,03)
Periplásmica	9,3 (13,5)	0,69 (1)	0,66 (0,96)
Membranar	10,3 (11,4)	0,90 (1)	0,86 (0,95)

O conteúdo é expresso em mole de elemento por mole de enzima de massa molecular 110 kDa. Entre parêntesis mostram-se valores calculados assumindo 1 mole de Ni por mole de enzima.

VI.2.3-Espectroscopia de visível e ultravioleta

As hidrogenases de *D.baculatus* têm cor castanho dourado e apresentam espectros de visível-ultravioleta típicos de proteínas contendo centros ferro-enxofre (Figura VI.1), com uma banda alargada a cerca de 390 nm e uma banda a 277 nm. Os espectros das várias hidrogenases são todos semelhantes.

TABELA VI.3: Espectros de visível das hidrogenases de *D.baculatus*

Fracção	λ (nm)	Bandas	ϵ (mM ⁻¹ .cm ⁻¹)	A_{390}/A_{280}
Citoplásmica	390 277		54 193	0,28
Periplásmica	390 277		48 192	0,25
Membranar	390 277		-- --	I-0,1 II-0,14

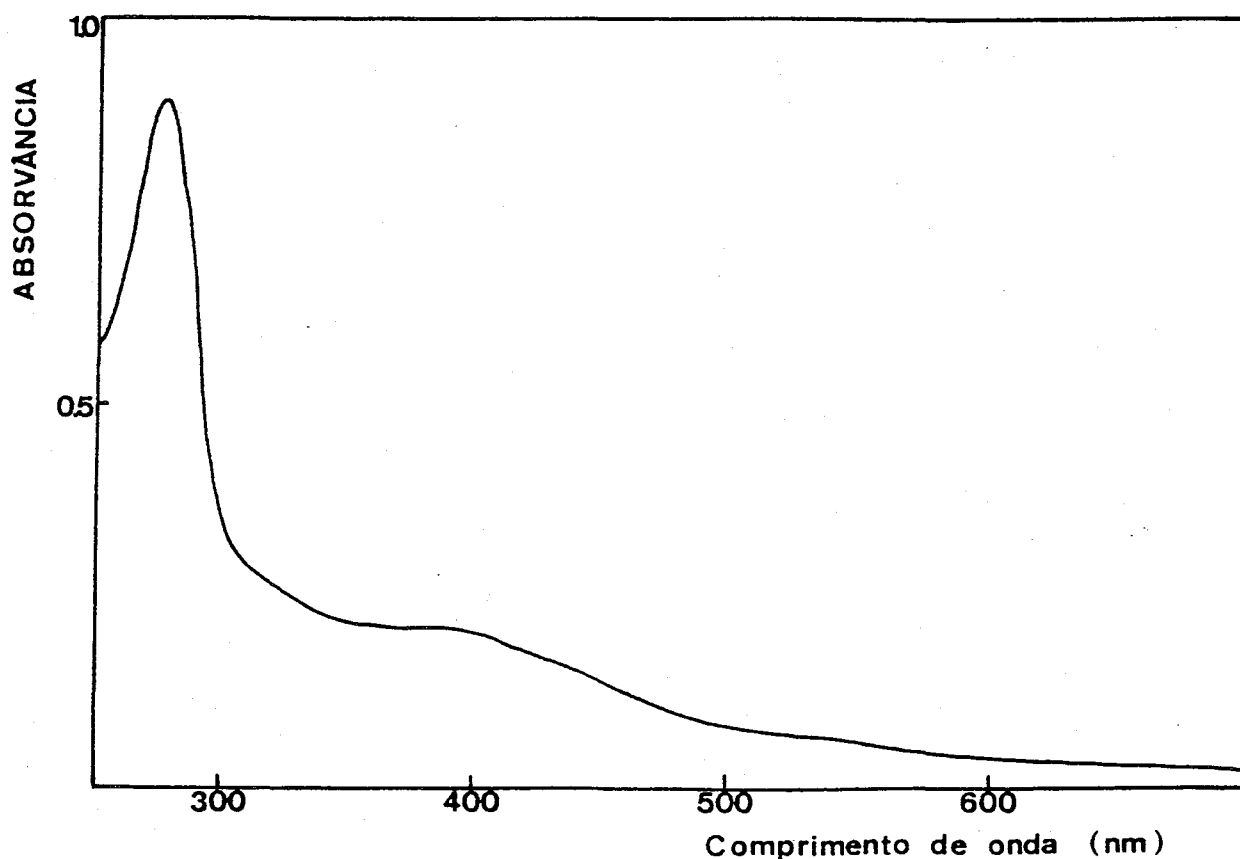
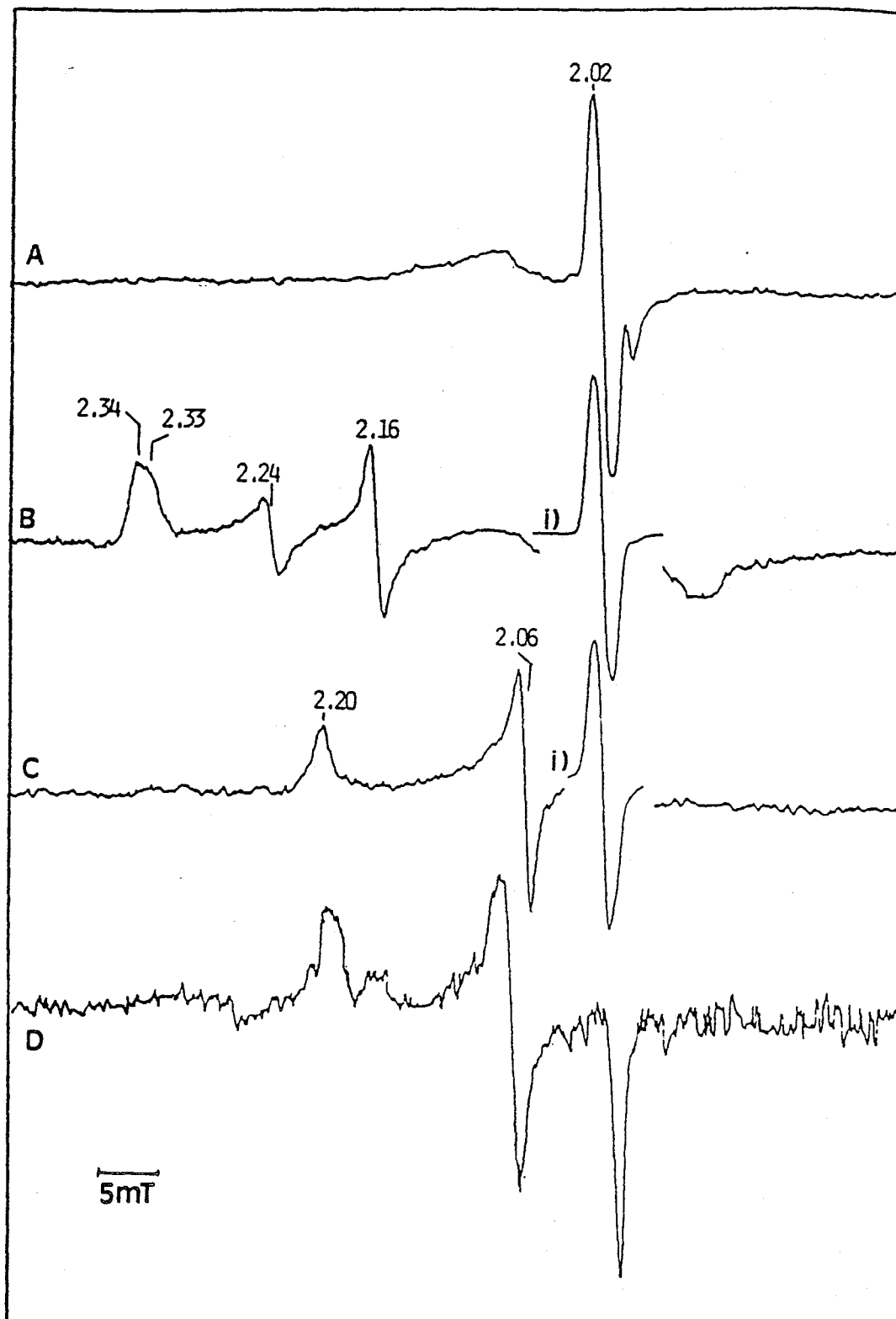


Figura VI.1: Espectro de visível da hidrogenase periplásmica nativa de *D.baculatus*

VI.3-Estudos de ressonância paramagnética electrónica do estado nativo

Os espectros de RPE das hidrogenases nativas de *D.baculatus* apresentam características diferentes (Figura VI.2 e Tabela VI.4).

INTENSIDADE RELATIVA



CAMPO MAGNETICO →

Figura VI.2: Espectros de RPE das hidrogenases nativas de *D.baculatus*. Temperatura e ganho:
A- Hidrogenase citoplasmica, $T=8\text{ K}$, $2,5 \times 10^5$
B- Hidrogenase membranar, $T= 7,5\text{ K}$, 10^6 , i) 5×10^3
C- Hidrogenase periplasmica, $T= 8\text{ K}$, 10^6 , i) 5×10^4
D- Hidrogenase periplasmica, $T= 77\text{ K}$, $3,2 \times 10^5$
Frequência-9,41 GHz, excepto D-9,28 GHz;
Modulação: 1 mT; Potência de microondas: 2 mW

A hidrogenase citoplasmica (Figura VI.2-A) é praticamente silenciosa em RPE, mostrando apenas a baixa temperatura um sinal quase isotrópico centrado a $g=2,015$, de muita fraca intensidade, detectável até cerca de 35 K. Por integração deste sinal obtém-se um valor inferior a 0,001 spin/mol. O espectro da hidrogenase membranar é dominado a baixa temperatura por um intenso sinal isotrópico (Figura VI.2-B), ainda detectável a 40 K, embora já bastante alargado, e correspondendo a valores inferiores a 0,1 spin/mol. Observa-se também um sinal rômico a valores de campo magnético mais baixo, que é detectado mais facilmente a temperaturas superiores a 30 K, às quais se revela um sinal complexo com valores de g a 2,34, 2,33, 2,23, 2,16 e provavelmente a $g \approx 2,0$, sob o sinal isotrópico (Figura VI.2-B). Este sinal pode ser decomposto em duas componentes subespectrais por comparação com a hidrogenase de *D.gigas*, correspondentes a dois sinais rômicos com valores de g a 2,34, 2,16 e $\approx 2,0$ (valores análogos ao Sinal Ni B daquela enzima) e a 2,33, 2,23 e $\approx 2,0$ (semelhante ao Sinal Ni A). A hidrogenase periplasmica, para além de um sinal isotrópico também de fraca intensidade e centrado a $g=2,015$ (Figura VI.2-C), observável até perto de 35 K, revela a temperaturas superiores um sinal rômico com valores de g a 2,20, 2,06 e 2,0 (Figura VI.2-D). Este sinal, embora com valores de g diferentes dos observados para as hidrogenases [NiFe], apresenta valores de g semelhantes aos encontrados para complexos de Ni(III) com ligandos peptídicos. De acordo com a análise de metais por emissão de plasma, esta hidrogenase só contém Ni e Fe, de entre as ligações de metais de transição que podem originar sinais de RPE com $S=1/2$, pelo que se poderá também atribuir aquele sinal de RPE

rômbico a um centro de níquel paramagnético, possivelmente Ni(III) numa geometria ou coordenação diferente da encontrada para outras hidrogenases [NiFe]. Os sinais de RPE de níquel apresentam intensidades muito fracas, indicando que a maior parte dos centros contendo este ião se encontram num estado silencioso em RPE.

As características dos sinais isotrópicos são compatíveis com a presença de um centro $[3\text{Fe-xS}]_{\text{ox}}$ nestas hidrogenases. Contudo, e como foi referido no capítulo V, a espectroscopia de RPE não permite uma identificação inequívoca deste tipo de centro, ou seja, não permite distinguir entre um centro $[3\text{Fe-xS}]_{\text{ox}}$ e um centro $[4\text{Fe-4S}]^{3+/2+}$ no estado paramagnético (estado de oxidação +3).

TABELA VI.4: Sinais de RPE das hidrogenases de *D.baculatus*

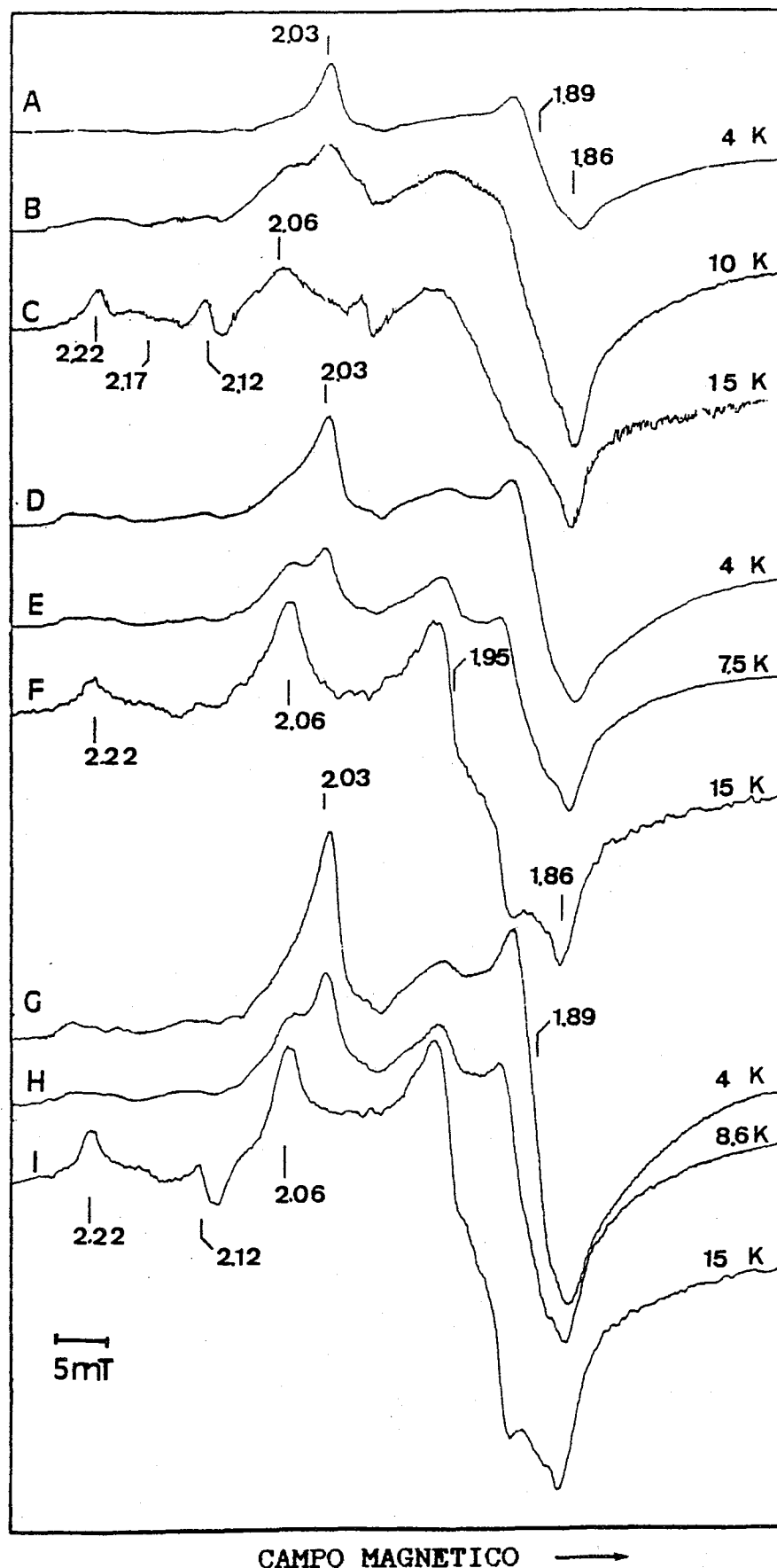
Hidrogenase	Centro	Valor de g			Largura de linha		
		g_x	g_y	g_z	W_{xx}	W_{yy}	$W_{zz} \text{ (b)}$
Citoplásmica	Ni	--	--	--	--	--	--
	$[3\text{Fe-xS}](a)$	--	2,015	--	--	16,5(c)	--
Membranar	Ni-A	2,33	2,23	~2,0	--	16,2	--
	Ni-B	2,34	2,16	~2,0,	--	13,5	--
	$[3\text{Fe-xS}](a)$	--	2,015	--	--	19,0(c)	--
Periplásmica	Ni	2,20	2,06	2,0	21,6	13,5	11
	$[3\text{Fe-xS}](a)$	--	2,015	--	--	16,5(c)	--

(a) Valor de g_{med} ; (b) Valor em mT; (c) Largura total do sinal

VI.4-Estudos de ressonância paramagnética electrónica do estado reduzido

Por redução das hidrogenases de *D.baculatus* sob hidrogénio ou por adição de ditionito de sódio os sinais de RPE presentes no estado nativo desaparecem, sendo substituídos por sinais complexos a baixa temperatura (Figura VI.3).

INTENSIDADE RELATIVA



CAMPO MAGNETICO →

Figura VI.3: Sinais de RPE das hidrogenases de *D. baculatus* reduzidas sob hidrogênio
 A-C: Hidrogenase citoplásmica
 D-F: Hidrogenase membranaar
 G-I: Hidrogenase periplásmica
 Temperatura: A-4K; B-10 K; C-15 K; D-4 K;
 E-7,5 K; F-15 K; G- 4K; H-8,6 K; I- 15 K
 Ganho variável; Outras condições como na Fig.VI.2

Estes sinais, por estudos de dependência com a temperatura ou com a potência da radiação de microondas podem ser decompostos em vários sinais, atribuíveis a espécies de níquel ou a centros Fe/S. Apesar das diferenças observadas nos espectros de RPE do estado nativo, os sinais detectados nos estados reduzidos são semelhantes para todas as hidrogenases de *D.baculatus*. Por isso, serão analisadas em detalhe apenas as características dos sinais de RPE das hidrogenases periplásmica e citoplásmica.

Nas figuras VI.4-5,7 mostram-se espectros de RPE da hidrogenase periplásmica reduzida com ditionito de sódio ou ao fim de diferentes tempos de incubação sob hidrogênio.

A temperaturas a cerca de 4 K o espectro de RPE é dominado por um intenso sinal rômico com valores de g a 2,03 , 1,89 e 1,86. Este sinal não é detectável a temperaturas superiores a 15 K, tendo características de relaxação rápida. Por estas propriedades pode ser atribuído a um centro $[4Fe-4S]^{1+}$ (centro I). A temperaturas superiores a 6 K revela-se outro sinal rômico, detectável até cerca de 30 K, embora já bastante alargado a esta temperatura, com valores de g a 2,06 , 1,95 e 1,88 . Este sinal corresponde provavelmente a outro centro $[4Fe-4S]^{1+}$ (Centro II), com relaxação electrónica mais lenta que o Centro I. Assim, os sinais observados a temperaturas intermédias resultam possivelmente de uma sobreposição destes dois sinais.

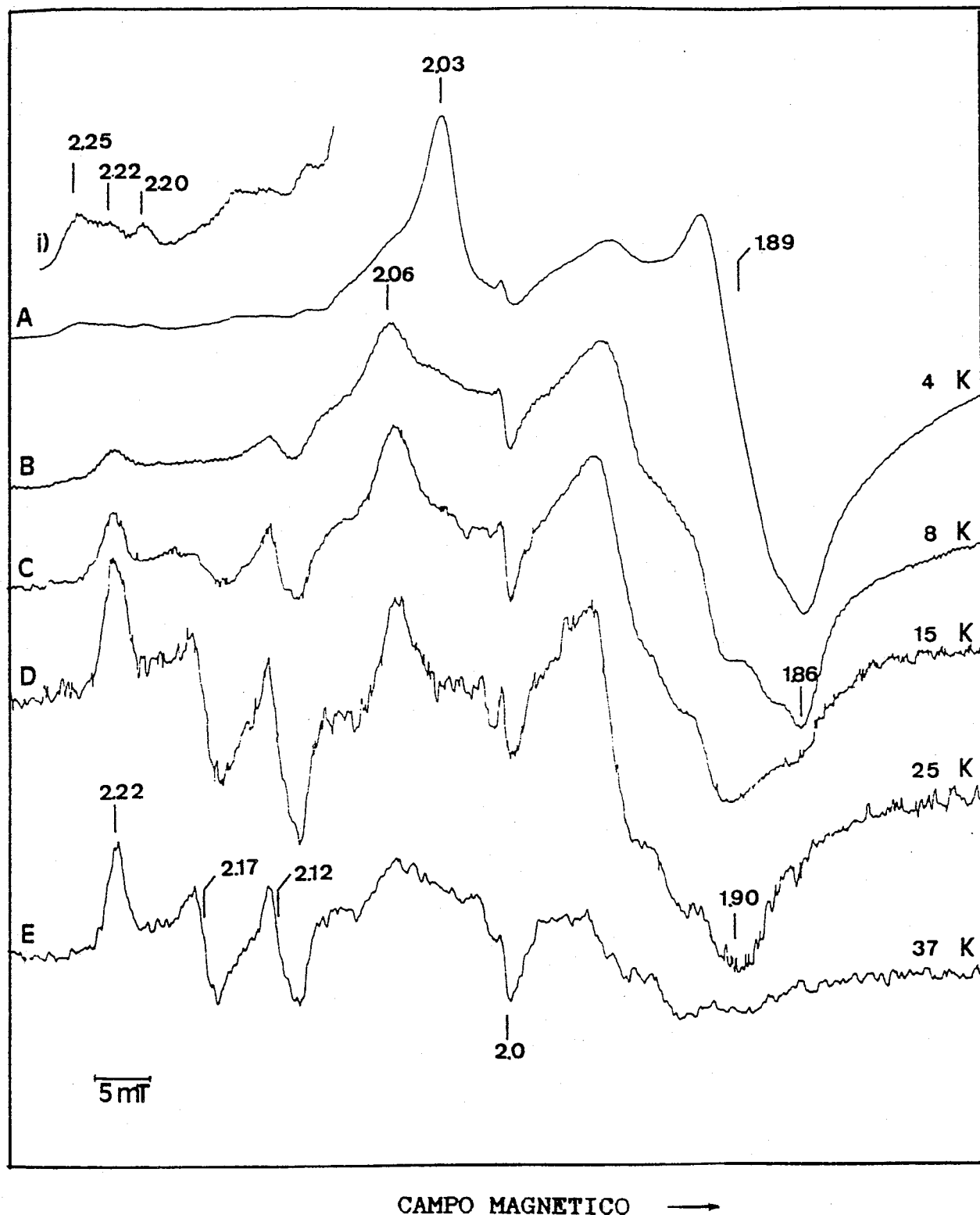


Figura VI.4: Espectros de RPE da hidrogenase periplásmica de *D. baculatus* reduzida sob hidrogênio. Temperatura e Ganho: A-4 K, $1,2 \times 10^4$ (i)- $1,2 \times 10^5$; B- 8 K, $1,2 \times 10^5$; C-15 K, $2,5 \times 10^5$; D-25 K, 5×10^5 ; E- 37 K, 8×10^5 . Outras condições como na Fig. VI.3

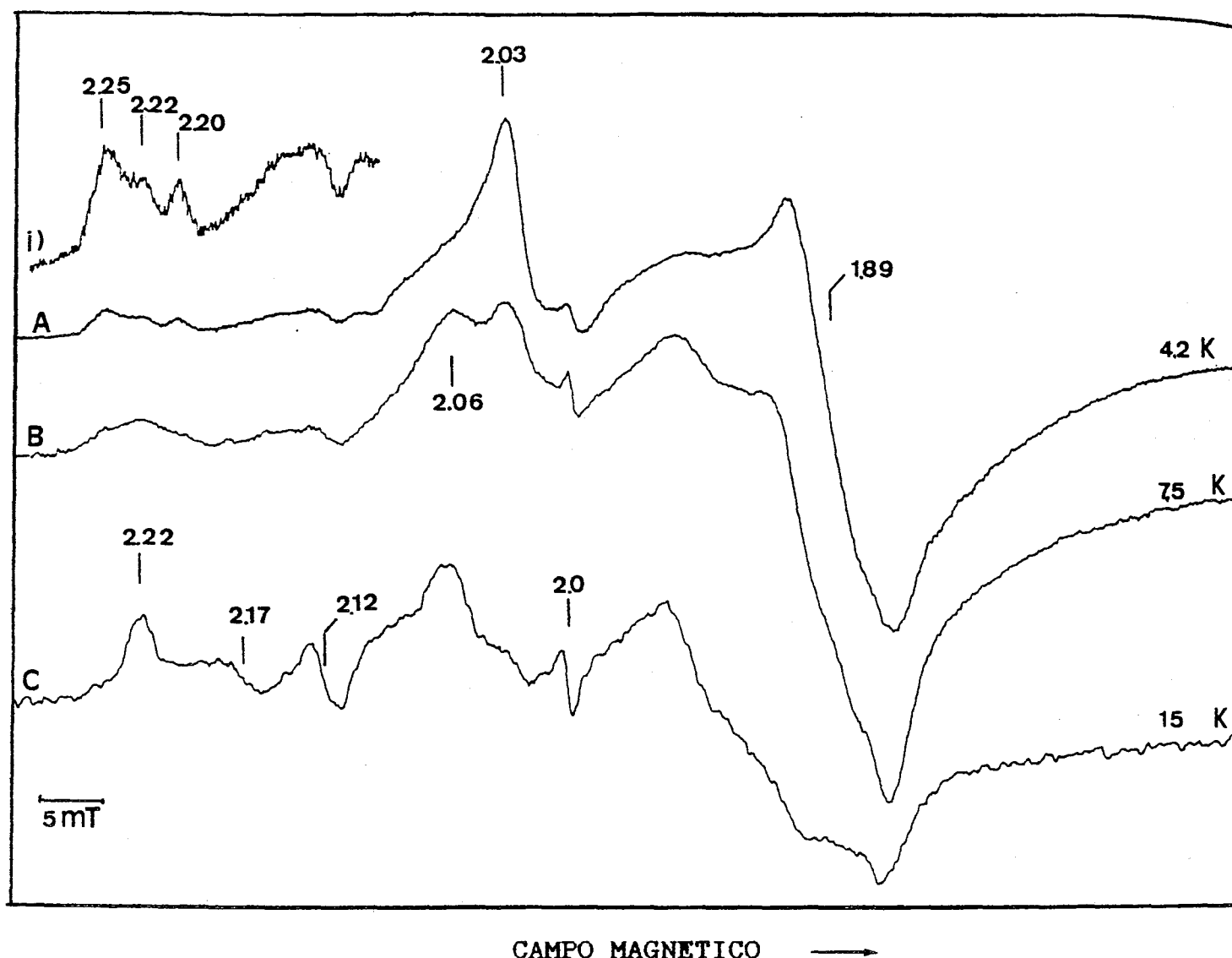


Figura VI.5: Espectros de RPE da hidrogenase periplasmica de *D. baculatus* reduzida ao fim de um tempo de incubação mais longo sob H_2 . Temperatura e Ganho: A-4,2 K, $3,2 \times 10^4$ (i) $1,2 \times 10^5$); B- 7,5 K, 8×10^4 ; C- 25 K, 2×10^5 . Outras condições como na Figura VI.2

Nas amostras mais reduzidas que foram obtidas (Figura VI.5) a intensidade do sinal a $g=2,06$ parece superior, sugerindo uma ligeira diferença de potenciais redox de ambos os centros [4Fe-4S]. Nestas amostras os sinais de RPE destes centros correspondem a 0,42 (hidrogenase citoplasmica) e 0,93 (hidrogenase periplasmica) spin/mol de enzima. A valores de campo magnetico

mais baixo detectam-se sinais complexos, com valores de g a 2,25 2,22 , 2,17 , 2,12 e 2,10. Na figura VI.7 mostra-se uma dependência com a temperatura dos espectros de RPE da hidrogenase citoplasmica reduzida sob hidrogénio, nos quais são mais claramente detectados estes sinais.

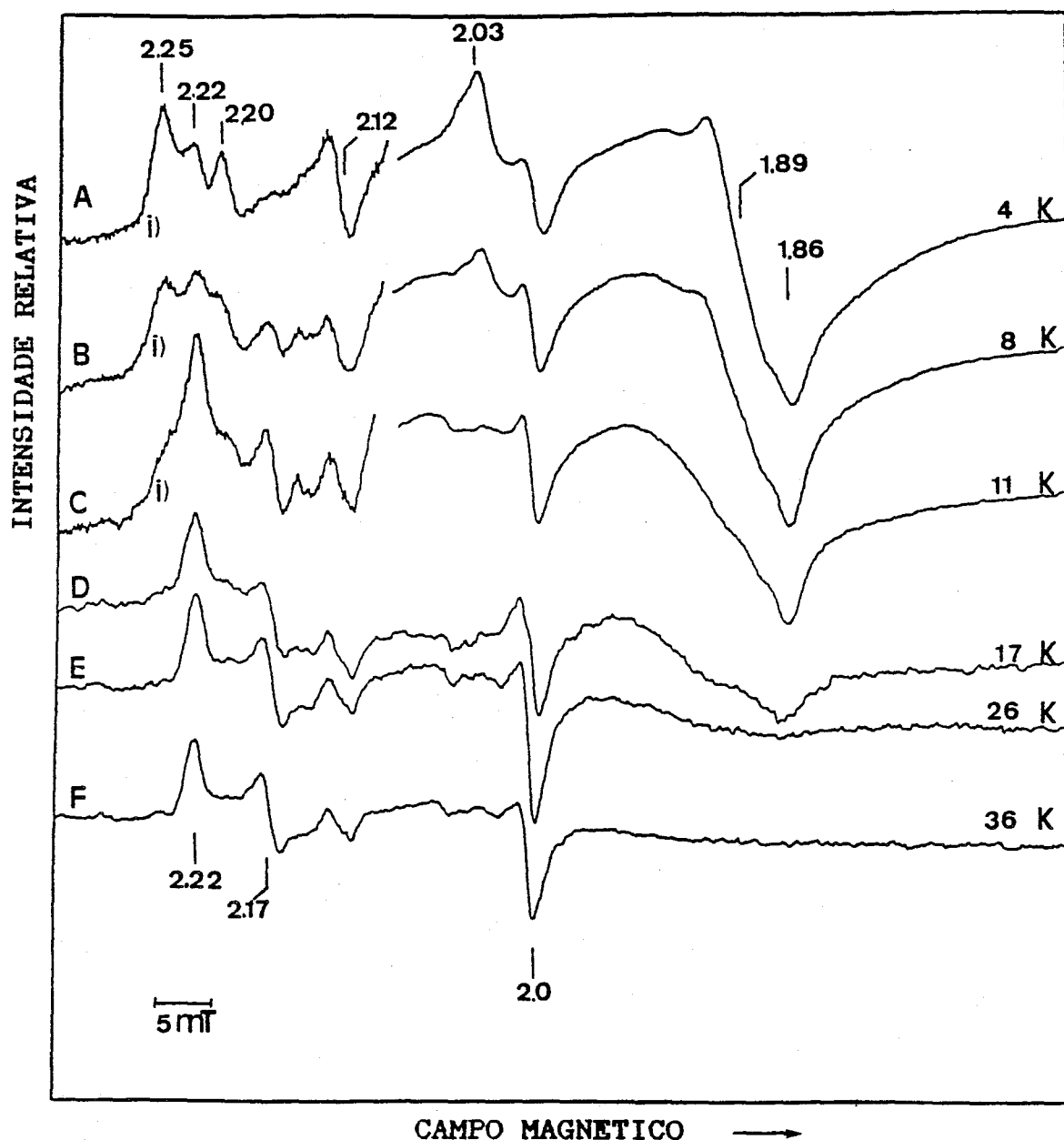
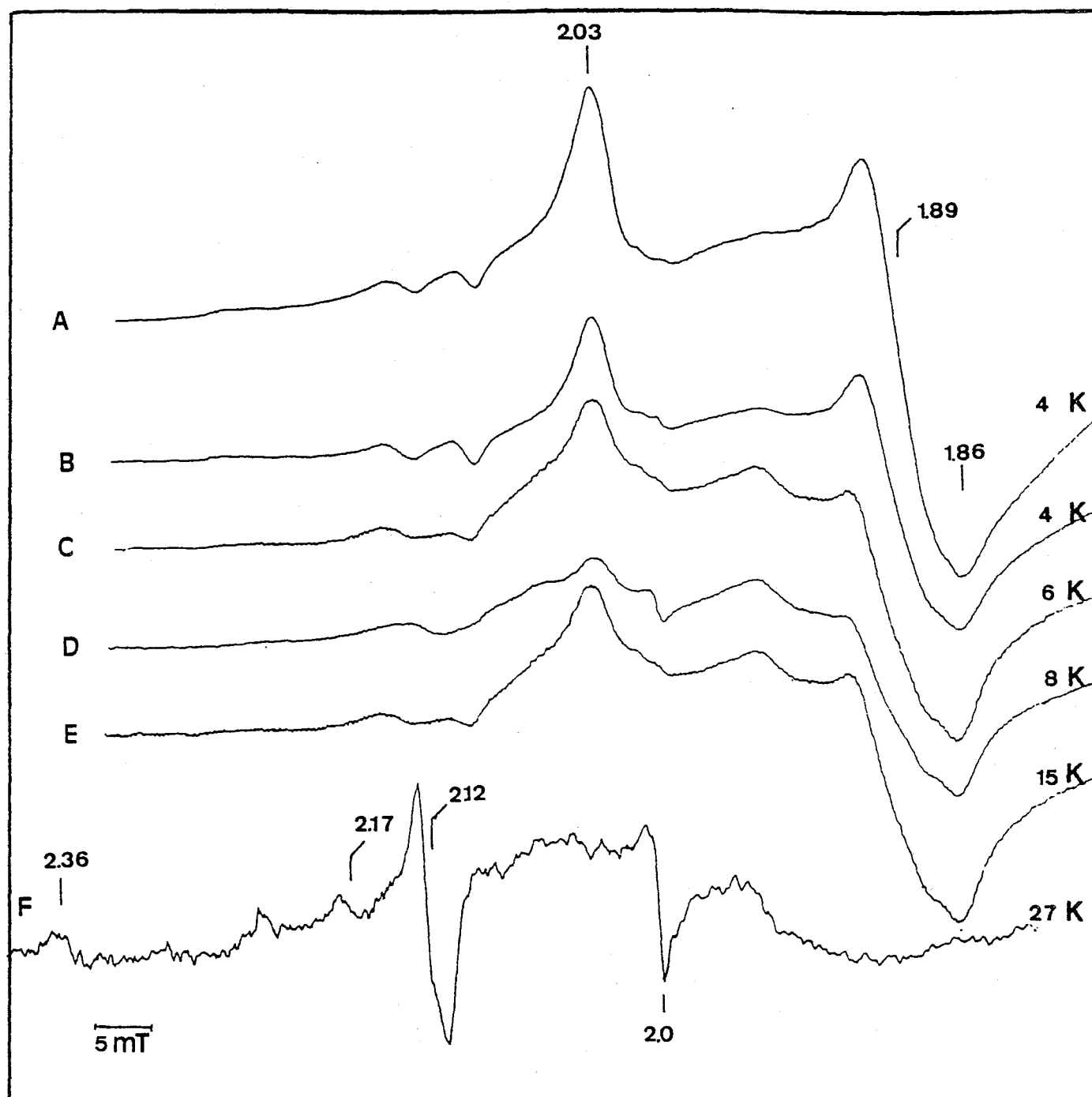


Figura VI.6: Espectros de RPE da hidrogenase citoplasmica de *D.baculatus* reduzida sob hidrogénio Temperatura e ganho: A-4 K, $3,2 \times 10^4$, i) 10^5 ; B-8 K, $3,2 \times 10^4$, ii) 10^5 ; C-10 K, 5×10^4 , iii) 10^5 ; D- 17 K, 2×10^5 ; E-26 K, 2×10^5 ; F-36 K, 2×10^5 . Outras condições como na Figura VI.2

O sinal complexo apresenta uma relaxação rápida, sendo já dificilmente observado à temperatura de 11 K. A temperaturas superiores revela-se um sinal rômboico, com valores de g a 2,20, 2,17 e 2,02. Estes sinais têm propriedades bastante semelhantes às observadas para o sinal a $g=2,21$ e o Sinal Ni-C (valores de g a 2,19, 2,14 e 2,02) da hidrogenase de *D.gigas* reduzida sob hidrogénio. Assim, o sinal a $g=2,20$ da hidrogenase de *D.baculatus* tem valores de g e propriedades de relaxação (dependência com a temperatura) que o permitem comparar com o sinal a $g=2,19$ daquela enzima. Por outro lado, os sinais complexos a baixa temperatura podem possivelmente ser interpretados como uma sobreposição de um sinal semelhante ao sinal a $g=2,21$ da hidrogenase de *D.gigas* (sinal a $g=2,25$ e $g=2,10$) e do sinal a $g=2,22$, saturado a baixas temperaturas à potencia de radiação de microondas utilizada (2 mW). Comparando os espectros de RPE das figuras VI. 4-7, verifica-se que nas amostras mais reduzidas o sinal a $g=2,22$ diminui de intensidade, tal como observado para o sinal Ni-C de *D.gigas*. Devido a estas características, aquele sinal pode ser atribuído a uma espécie paramagnética de níquel (Ni(III) ou Ni(I)), com $S=1/2$. A origem do sinal complexo é ainda desconhecida, podendo não resultar de uma espécie de níquel. Uma análise mais correcta destes sinais só é possível por um estudo detalhado da dependência com a potência da radiação de microondas, semelhante ao efectuado para a hidrogenase de *D.gigas*.

Em alguns estados de redução das hidrogenases de *D.baculatus* detecta-se um sinal de RPE axial, com valores de g a 2,36 e 2,12, de origem desconhecida, e aparentemente mais intenso nas amostras mais reduzidas (Figura VI.7).



CAMPO MAGNETICO →

Figura VI.7: Espectros de RPE da hidrogenase periplasmica de *D. baculatus* reduzida com ditionito de sódio
 Temperatura e ganho: 4 K, $2,5 \times 10^3$; B-4 K, $8,4 \times 10^4$;
 C- 6 K, $1,2 \times 10^5$; D-8 K, $1,2 \times 10^5$; E-15 K, $1,6 \times 10^5$;
 F- 27 K, 8×10^5 . Potência: 2 mW, excepto A- 63,2 mW.
 Outras condições como na Figura VI.2

VI.5-Titulação redox da hidrogenase citoplasmica

Foi efectuada uma titulação de oxidação/redução da hidrogenase citoplasmica de *D.baculatus*, sob hidrogénio e seguida por RPE, entre -250 e -450 mV (Ver Apêndice), a pH=7,6. As amostras foram estudadas apenas a 22 K, observando-se somente o sinal a $g=2,22$. A curva de titulação obtida representa-se na figura VI.8. Como não é conhecido o valor da intensidade máxima deste sinal, os valores foram representados como percentagem da intensidade máxima.

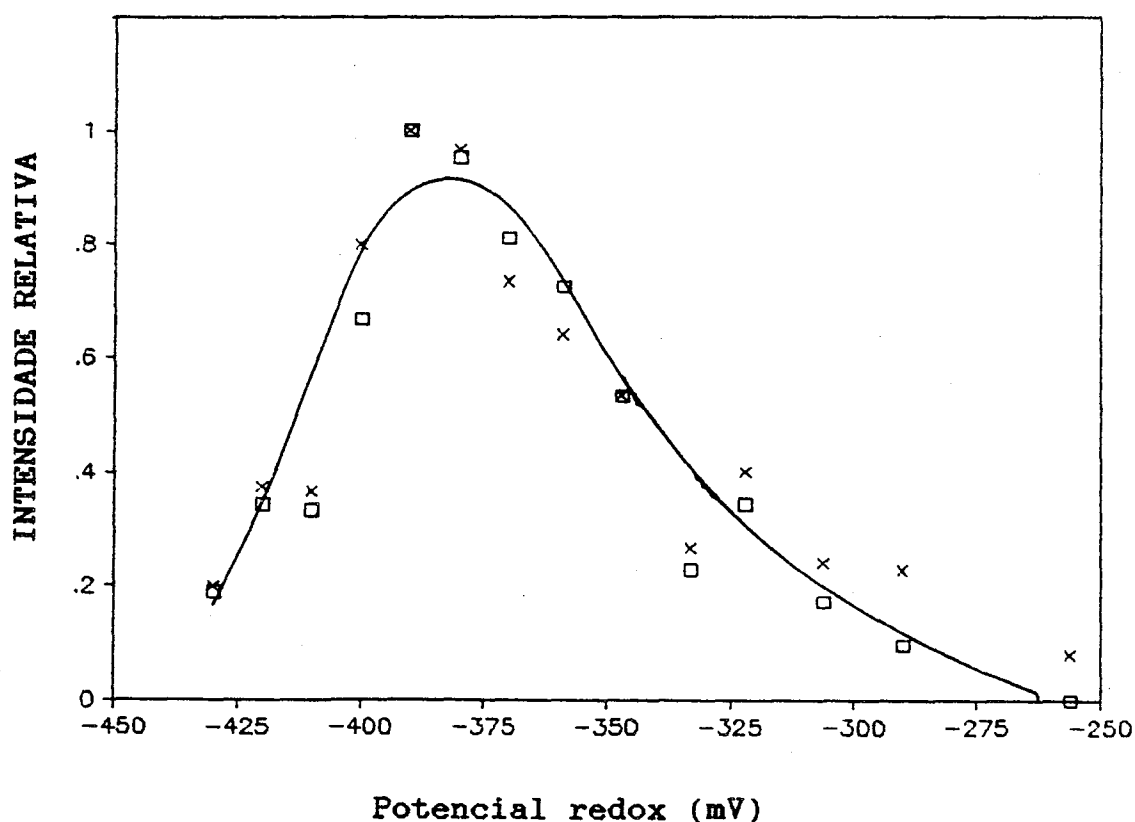


Figura VI.8: Curva de titulação redox sob hidrogénio do sinal de RPE a $g=2,22$ da hidrogenase citoplasmica de *D.baculatus*, a pH=7,6 . Intensidade do sinal de RPE a $g=2,22$ (x) e a $g=2,16$ (□) a 22 K , em função do potencial redox

Verifica-se que o sinal se forma a potenciais inferiores a -250 mV, atinge um máximo de intensidade a cerca de -400 mV, e decresce de intensidade a potenciais inferiores, sendo dificilmente detectável a - 430 mV. Este comportamento é bastante semelhante ao do sinal a $g=2,19$ da hidrogenase de *D.gigas*.

VI.6-Actividade catalitica

Foi determinada a actividade especifica de produção de hidrogénio e de permuta D_2/H^+ das três fracções de hidrogenase de *D.baculatus* (Tabela VI.5).

TABELA VI.5: Actividade catalitica das hidrogenases de *D.baculatus* (a)

Fracção	Produção H_2	Produção HD	Permuta H_2/HD
Membranar	122	37	1,36
Periplásmica	526,5	125,7	1,51
Citoplásmica	466,6	118,2	1,35

(a) - Actividade especifica:
 $\mu\text{mol de } H_2 \text{ (ou HD) produzido. min}^{-1} . \text{mg}^{-1}$, a pH=7,8

i) Actividade de produção de H_2

Foi estudado o efeito do pH na actividade de produção de hidrogénio das hidrogenases das fracções periplásmica e citoplásmica. A actividade máxima foi obtida a valores acidicos de pH (cerca de 4). Verificou-se que a actividade depende fortemente do tipo de solução tampão utilizada (por exemplo, é maior em Tris/HCl que em fosfato). A actividade máxima de consumo de

hidrogénio, determinada por Lespinat et al (6), ocorre a pH=7,5.

ii) Actividade de permuta D_2/H^+

Foi estudada em detalhe a dependência com o pH da actividade de permuta D_2/H^+ das hidrogenases solúveis, em colaboração com o grupo do Prof. J. LeGall (Cadarache). O máximo de actividade de permuta D_2/H^+ ocorre a valores de pH ácido, notando-se uma diferença entre as actividades de produção dos produtos de permuta HD e H_2 . Para o primeiro, a actividade máxima de produção verifica-se a valores bastante baixos de pH (cerca de pH=3), enquanto para o segundo o máximo ocorre a pH perto de 5 (Figura VI.9).

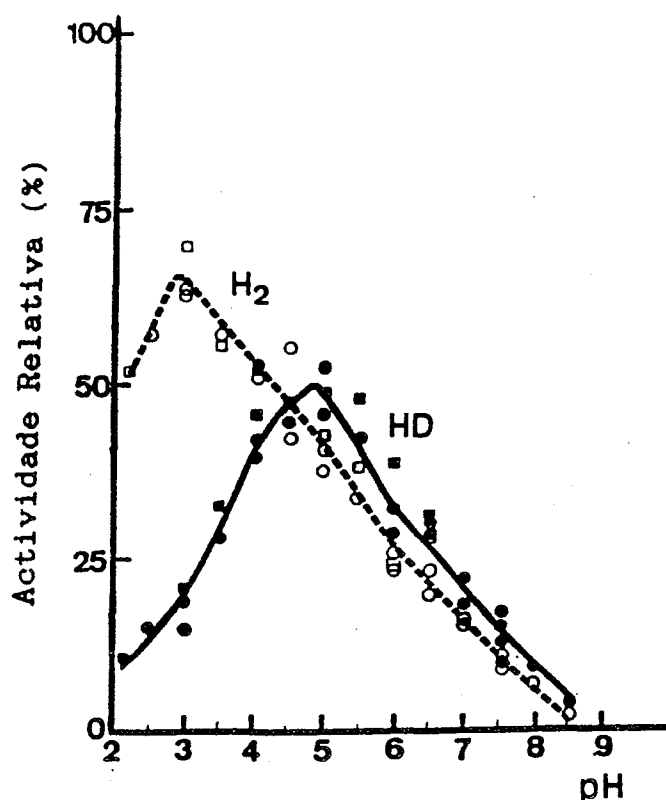


Figura VI.9: Dependência com o pH da actividade de permuta D_2/H^+ da hidrogenase citoplasmática de *D. baculatus* (6)

Observou-se ainda que a razão das velocidades de formação dos produtos de permuta é fortemente dependente do pH (Figura VI.10).

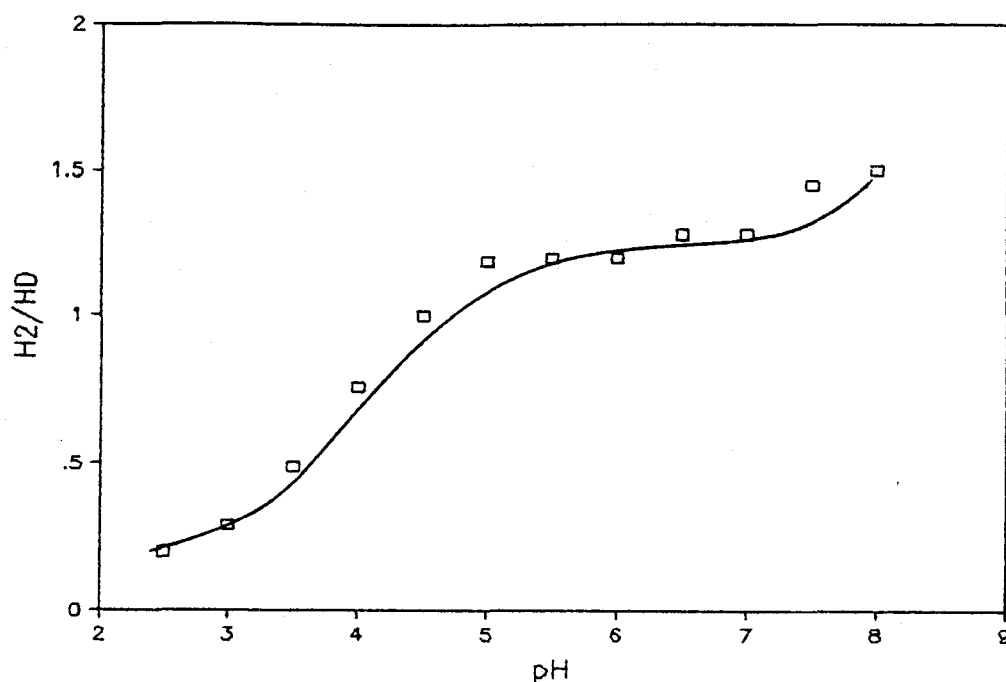


Figura VI.10: Variação com o pH da razão H_2/HD na reacção de permuta catalisada pela hidrogenase citoplásmica de *D.baculatus*

Para a hidrogenase citoplásmica, a razão H_2/HD é superior a 1 a valores de pH superiores a 4,5, enquanto para valores de pH inferiores aquela razão é menor que 1, aproximando-se dos valores obtidos para a hidrogenase de *D.gigas*, para a qual esta razão é sempre inferior a 1 entre pH=5 e pH=10 (6). Este resultado sugere que esta razão pode depender de características ácido-base e das velocidades de permuta de protão com o solvente dos centros de ligação do protão e do ião hidreto resultantes da cisão heterolítica da molécula de hidrogénio. Seria interessante

realizar estudos semelhantes para os dois tipos de hidrogenase: as que apresentam a razão H_2/HD maior que 1 e as que apresentam aquela razão inferior a 1, correlacionando os resultados obtidos com a constituição dos centros activos das hidrogenases. É de salientar que as hidrogenases do tipo [NiFe] contendo selénio (hidrogenases de *D.baculatus* e de *D.salexigens*) apresentam nas condições padrão de ensaio da actividade de permuta (pH=7,6) razões H_2/HD superiores a 1, o que sugere um possível envolvimento do selénio no centro catalítico, eventualmente como o sítio de aceitação do protão.

VI.7-Referências

- 1) G.Fauque, (1985), Thèse de Doctorat, Université de Compiègne
- 2) F.Guerlesquin, J.J.G.Moura and R.Cammack, (1982), Biochim. Biophys.Acta, 679, 423-427
- 3) S.H.Bell, D.P.E.Dickson, R.Rieder, R.Cammack, D.S.Patil, D.O. Hall and K.K.rao, (1984), Eur.J.Biochem., 145, 645-651
- 4) M.Teixeira, I.Moura, G.Fauque, A.V.Xavier, J.LeGall and J.J. G.Moura, (1984), resultados não publicados
- 5) R.L.Starkey, (1938), Arch.Microbiol., 9, 268
- 6) P.A.Lespinat, Y.Berlier, G.Fauque, M.H.Czechowski, B.Dimon and J.LeGall, (1986), Biochimie, 68, 59-61

CAPITULO VII:
HIDROGENASE DE
DESULFOVIBRIO SALEXIGENS

A bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio salexigens*, estirpe British Guiana (NCIB 8403) é a única estirpe halofílica bem estudada do género *Desulfovibrio*, necessitando de meios com alta concentração de sais para o seu crescimento. Apenas algumas proteínas desta bactéria têm sido estudadas: citocromo c_3 tetrahémico (1), flavodoxina (2), rubredoxina (2), desulfoviridina e uma proteína azul contendo centros ferro-enxofre e molibdénio (3). A hidrogenase desta bactéria foi isolada e caracterizada no decorrer deste trabalho (4,5).

VII.1-Purificação da hidrogenase de *D.salexigens*

VII.1.1-Preparação do extracto bruto

As células de *D.salexigens*, estirpe British Guiana, foram crescidas a 37° C no meio de lactato-sulfato a que foi adicionado NaCl a 3% (4). As células foram lisadas e congeladas. No início da purificação descongelaram-se as células e centrifugaram-se a 20.000 rpm durante 1,5 h. A solução sobrenadante de 250 g de células (peso seco) foi então novamente centrifugada duas vezes a 40.000 rpm durante 2 h.

VII.1.2-Purificação

A hidrogenase foi purificada aerobicamente a 4° C e usando-se soluções tampão (Tris-HCl e fosfato) a pH=7,6. Utilizaram-se dois processos diferentes de purificação.

Esquema 1 (4)

O quadro de purificação apresenta-se na Tabela VII.1. O extracto centrifugado foi carregado numa coluna de hidroxilapatite (5X29 cm) equilibrada em Tris-HCl 0,2 M. Lavou-se a coluna

com 500 ml desta solução tampão e estabeleceu-se um gradiente contínuo inverso de Tris-HCL 500 ml 0,2 M / 500 ml 0,01 M. Lavou-se em seguida a coluna com 300 ml de tampão fosfato 0,01 M e iniciou-se um gradiente contínuo de fosfato 0,01-0,4 M (1000 ml de cada). A hidrogenase eluiu apenas após a passagem na coluna de uma solução tampão de fosfato 0,4 M. Recuperou-se, neste passo de purificação, cerca de 80% da actividade hidrogenase na produção de hidrogénio. Concentrou-se a fracção contendo a hidrogenase até 8 ml num Diaflo com uma membrana YM 30 e dialisou-se contra 4500 ml de Tris-HCl 0,01 M. Durante a diálise formou-se um precipitado que se redissolveu em Tris-HCl 1 M. Verificou-se que a actividade na solução sobrenadante se reduzira cerca de 50% e que o precipitado ressuspendido não tinha actividade, sendo constituído essencialmente por citocromos. A proteína dialisada foi diluída 4 vezes com Tris-HCl 0,01 M e carregada numa coluna de DEAE-Biogel A (5X34 cm) equilibrada com Tris-HCL 0,01 M. Lavou-se então a coluna com o mesmo tampão e realizou-se um gradiente contínuo de Tris-HCl 0,01 M/ 0,3 M (1000 ml de cada). A hidrogenase eluiu a uma concentração 0,25 M de Tris, recuperando-se 85% de actividade neste último passo. A razão de absorvâncias A_{400}/A_{280} é de 0,275 e a actividade específica de produção de hidrogénio era de $602 \mu\text{mol H}_2 \text{ produzido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. O rendimento final deste passo foi de 30% . Após concentração com uma membrana YM 30, esta fracção foi carregada numa coluna de filtração em gel de HPLC (LKB-TSK G 3000 SW) equilibrada com tampão fosfato 0,5 M.

Por este processo de purificação obteve-se uma fracção contendo 14,5 mg de hidrogenase , considerada pura por electrofo-

rese em gel de poliacrilamida, com uma razão de absorvâncias A_{400}/A_{280} de 0,275 e uma actividade especifica de produção de hidrogénio de 758 mol H_2 produzido. $mg^{-1}.min^{-1}$.

TABELA VII.1: Purificação da Hidrogenase de *D.salexigens* (British Guiana) (Esquema 1) (4)

Fracção	Proteína (mg)	Actividade ^(a)		
		Total	Especifica	Permuta ^(b)
Extracto Bruto	12690	54.000	4,3	2
Coluna de HTP	n.d.	42.500	n.d.	n.d.
Diálise e centrifugação	210	19.500	93	28
DEAE-Biogel	27	16.300	602	175
HPLC	14,5	n.d	758	n.d.

(a) Actividade: Total- mol H_2/min ;
Especifica- mol H_2 produzido/min.mg
Permuta- mol $HD+H_2/min.mg$

(b) Permuta isotópica D_2/H^+
n.d. - não determinado

Esquema 2 (5)

Numa tentativa de reduzir os passos de purificação da hidrogenase de *D.salexigens* foi realizado outro esquema de purificação. Ambos os métodos possibilitaram a obtenção de fraccões de hidrogenase pura.

Após ruptura das células numa French Press a 60 MPa, o extracto bruto foi centrifugado durante 2 h a 8.000 rpm e dialisou-se a solução sobrenadante contra água destilada durante 24 h. A solução dialisada foi carregada numa coluna de DEAE-Biogel (6X34 cm) equilibrada com Tris-HCl 0,01 M. Aplicou-se um gradiente linear de Tris-HCl 0,01-0,5 M (1000 ml de cada), encon-

trando-se a hidrogenase numa fracção eluida a uma concentração de Tris-HCl de 0,3 M. Esta fracção foi aplicada a uma coluna de hidroxilapatite equilibrada com Tris-HCl 0,4 M. Realizou-se um gradiente descontinuo inverso de 0,4-0,01 M Tris-HCl e, em seguida, iniciou-se um gradiente continuo de tampão fosfato 0,001-0,6 M (500 ml de cada). A fracção contendo hidrogenase eluiu a uma concentração de fosfato de 0,5 M e foi concentrada num Diaflo (Amicon) com uma membrana YM 30.

VII.2-Caracterização Fisico-Quimica

VII.2.1-Massa Molecular

A massa molecular minima desta hidrogenase foi determinada por electroforese em geis de poliacrilamida na presença de SDS utilizando-se os seguintes padrões: fosforilase (94,0 kDa), albumina do soro bovino (67,0 kDa), ovalbumina (43,0 kDa), carbónico-anidrase (30,0 kDa), quimotripsinogénio (25 kDa), tripsina de grãos de soja (20,0 kDa) e albumina láctica (14,4 kDa). Determinou-se que a proteína contém pelo menos duas subunidades de massas moleculares de 62 e 36 KDa, pelo que a sua massa molecular minima será de 98 KDa (5).

VII.2.2-Análise Quimica

Por análise espectrofotométrica (TPTZ) determinou-se o conteúdo em ferro desta enzima : 12 ± 1 átomo-g de ferro por massa molecular minima. A análise por emissão de plasma detectou os seguintes metais em quantidades relevantes: 1 átomo-g de Ni, 1 átomo-g de Se e 15,5 átomo-g de Fe , também por massa molecular minima. Conjugando ambos os resultados, pode dizer-se

que esta enzima contém, por 96 KDa, os seguintes metais: 1 átomo-g de Ni, 12-15 átomo-g de Fe e 1 átomo-g de Se.

VII.2.3-Espectroscopia de Visível e ultravioleta

A hidrogenase de *D.salexigens* no estado nativo apresenta um espectro de absorção no ultra violeta e visível típico de proteínas contendo centros ferro-enxofre, com bandas alargadas a 400 e 280 nm e uma razão de absorvâncias A_{400}/A_{280} de 0,275 (Figura VII.1). A absortividade molar a 400 nm é de $54 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Por redução da enzima sob hidrogénio verifica-se um decréscimo da absorvância na zona do visível (400 nm) de cerca de 15%.

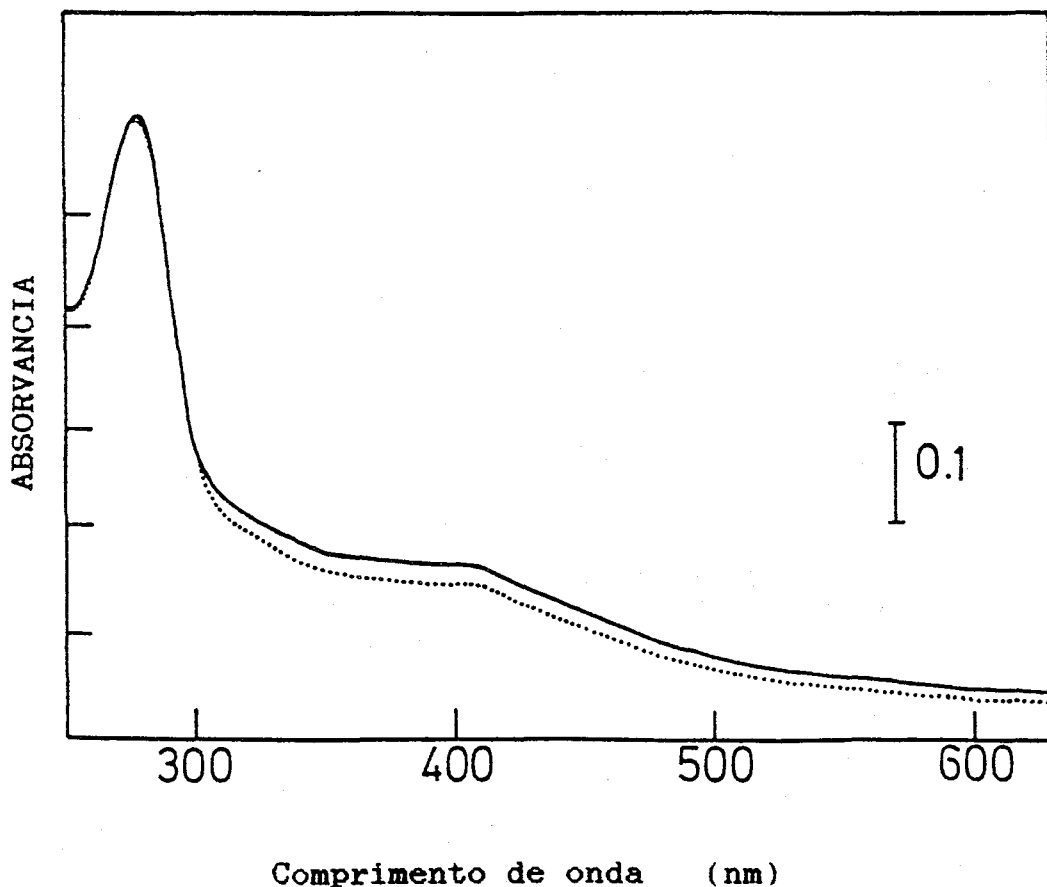


Figura VII.1:Espectro de ultravioleta e visível da Hidrogenase de *D.salexigens*.

[Hase]=3,75 uM,pH=7,6,tampão Tris-HCl 50 mM.

----- Enzima nativa ; - - - - - Enzima sob H_2 1 h

VII.3-Estudos de ressonância paramagnética electrónica

A hidrogenase de *D.salexigens* no estado nativo apresenta apenas um sinal de RPE a $g=2,0$, observável só a baixas temperaturas, inferiores a 20 K, e de muito fraca intensidade (Figura VII.2). A temperaturas mais elevadas a enzima é silenciosa em RPE.

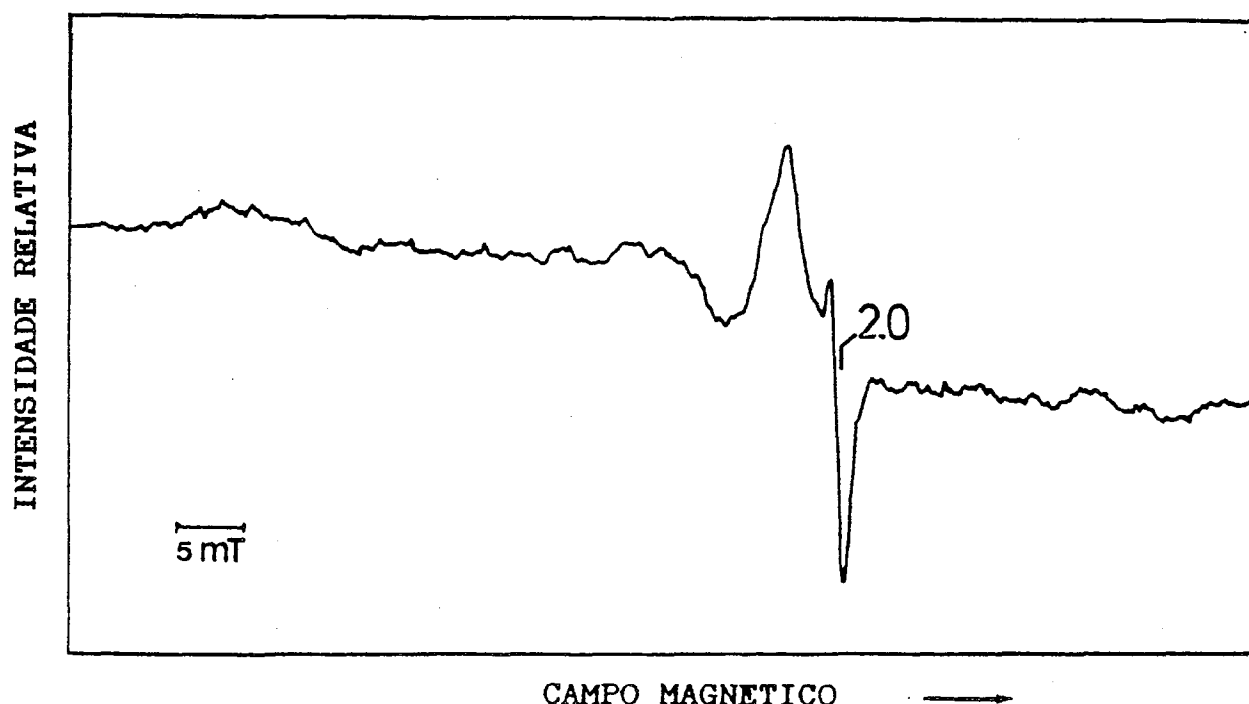


Figura VII.2: Espectro de RPE da hidrogenase de *D.salexigens* no estado nativo
Temperatura: 11 K; Potência de microondas: 2 mW
Frequência de microondas: 9,45 GHz; Amplitude de modulação: 1 mT

Por incubação da hidrogenase em atmosfera de hidrogénio durante diferentes tempos, na presença de mediadores redox, surge um sinal de RPE rômboico com valores de g a 2,22, 2,16 e 2,0 (Figura VII.3) que atinge um máximo de intensidade a valores intermédios de potencial redox (ver adiante). Este sinal é detectado optimamente a cerca de 40 K e satura rapidamente com a

potência de microondas a baixa temperatura, tendo um comportamento característico de uma espécie de relaxação lenta (Figura VII.4-A,B).

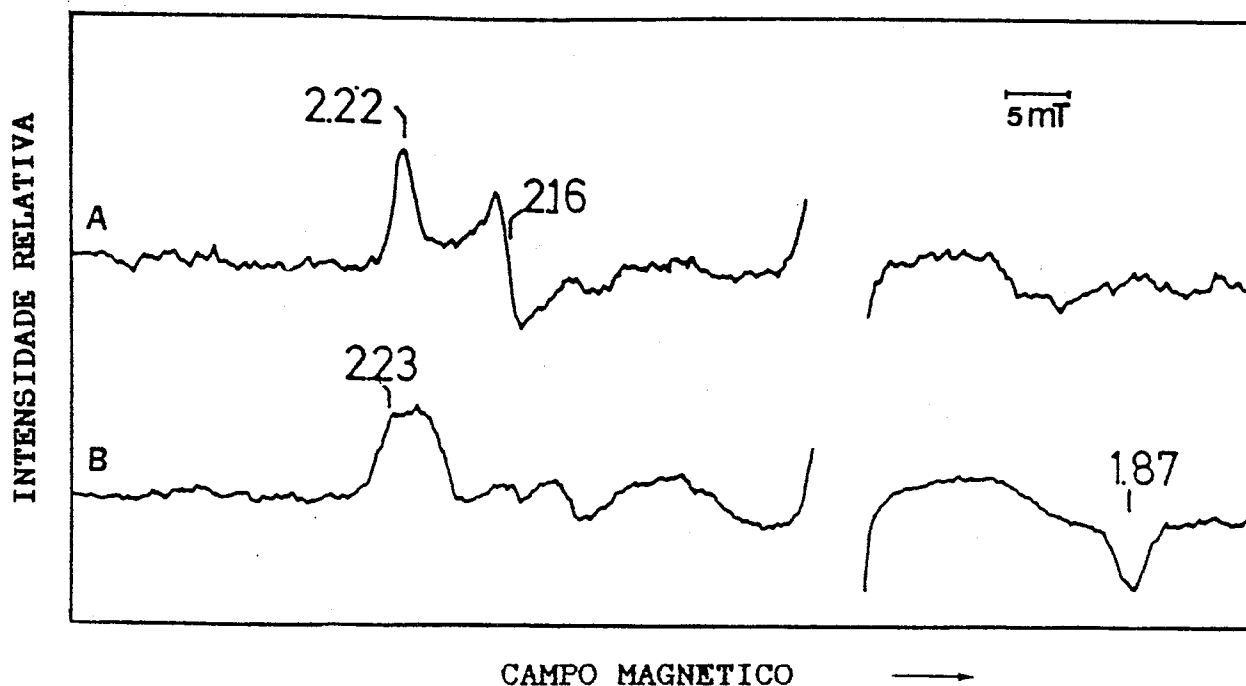


Figura VII.3: Espectros de RPE da hidrogenase de *D. salaxigens* reduzida sob H_2 (-380 mV)
Temperatura: 25 K(A) e 4,2 K (B)
Outras condições como na Fig.VII.2

Por incubação da enzima sob hidrogênio durante tempos mais longos o sinal a $g=2,22$ diminui de intensidade (Figura VII.5). Estudos de RPE a baixas temperaturas (inferiores a 10 K) em estados redox em que este sinal atingiu o máximo de intensidade, ou a valores inferiores de potencial, revelam a presença de outras espécies paramagnéticas, aparecendo um sinal de RPE complexo que pode ser decomposto, através de estudos de variação da temperatura e da potência de microondas, em pelo menos quatro sinais distintos:

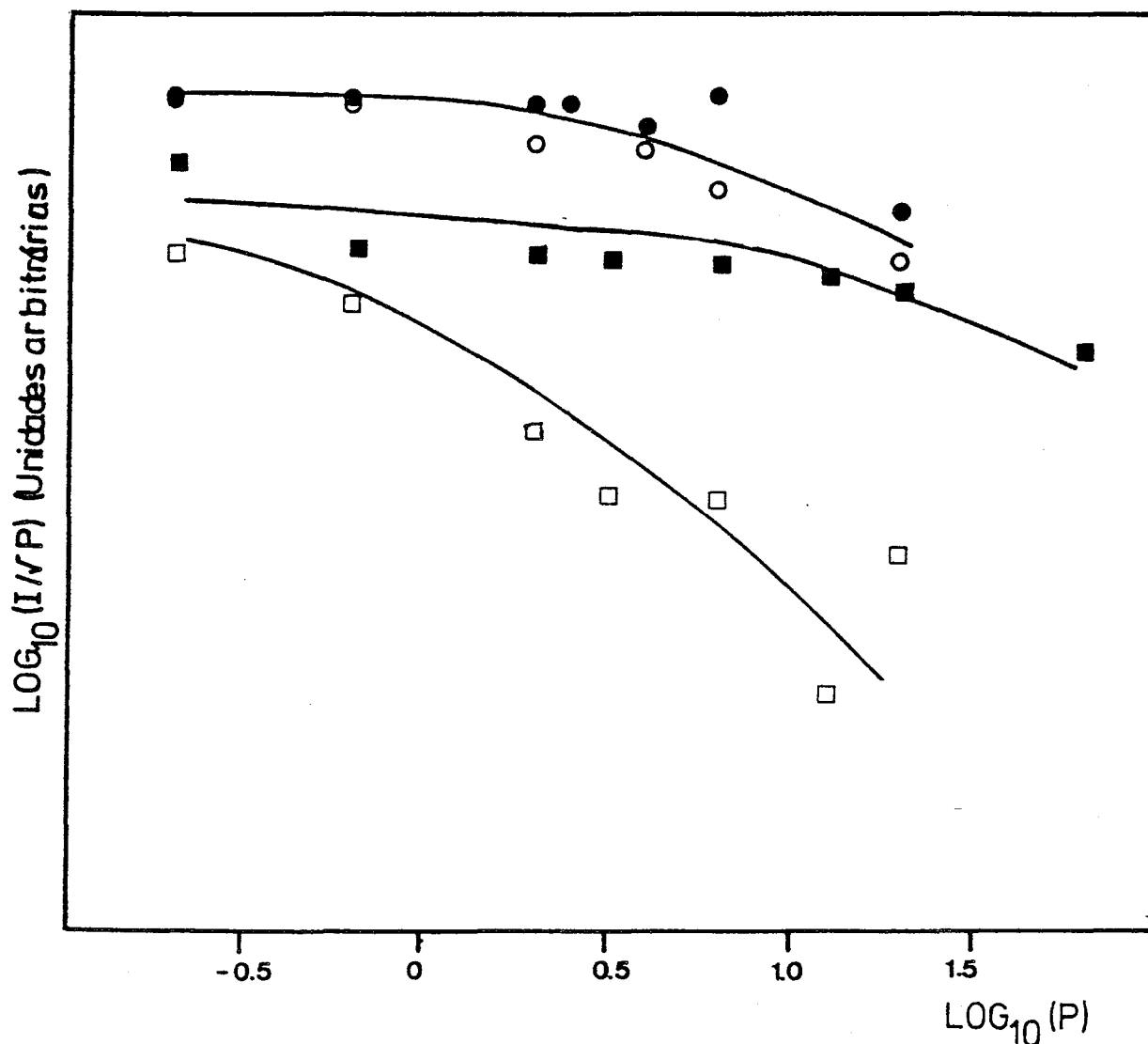


Figura VII.4: Dependência dos sinais de RPE da hidrogenase de *D. salaxigens* reduzida sob H_2 com a potência de microondas

(□) $g=2,22$, 4 K; (■) $g=2,23$, 4 K ;
 (●) $g=2,22$, 20 K; (○) $g=2,16$, 20 K.

-sinal a $g=2,22$ e a $g=2,16$, detectável a temperaturas superiores, que satura rapidamente a estas temperaturas (Figura VII.4-B);

-sinal com valores de g a 2,23 , 2,21 , 2,14 e componentes alargadas a valores de campo magnético superior, que tem um comportamento típico de uma espécie de relaxação electrónica rápida (Figura VII.4-C), e que é detectável apenas a temperaturas inferiores a 10 K;

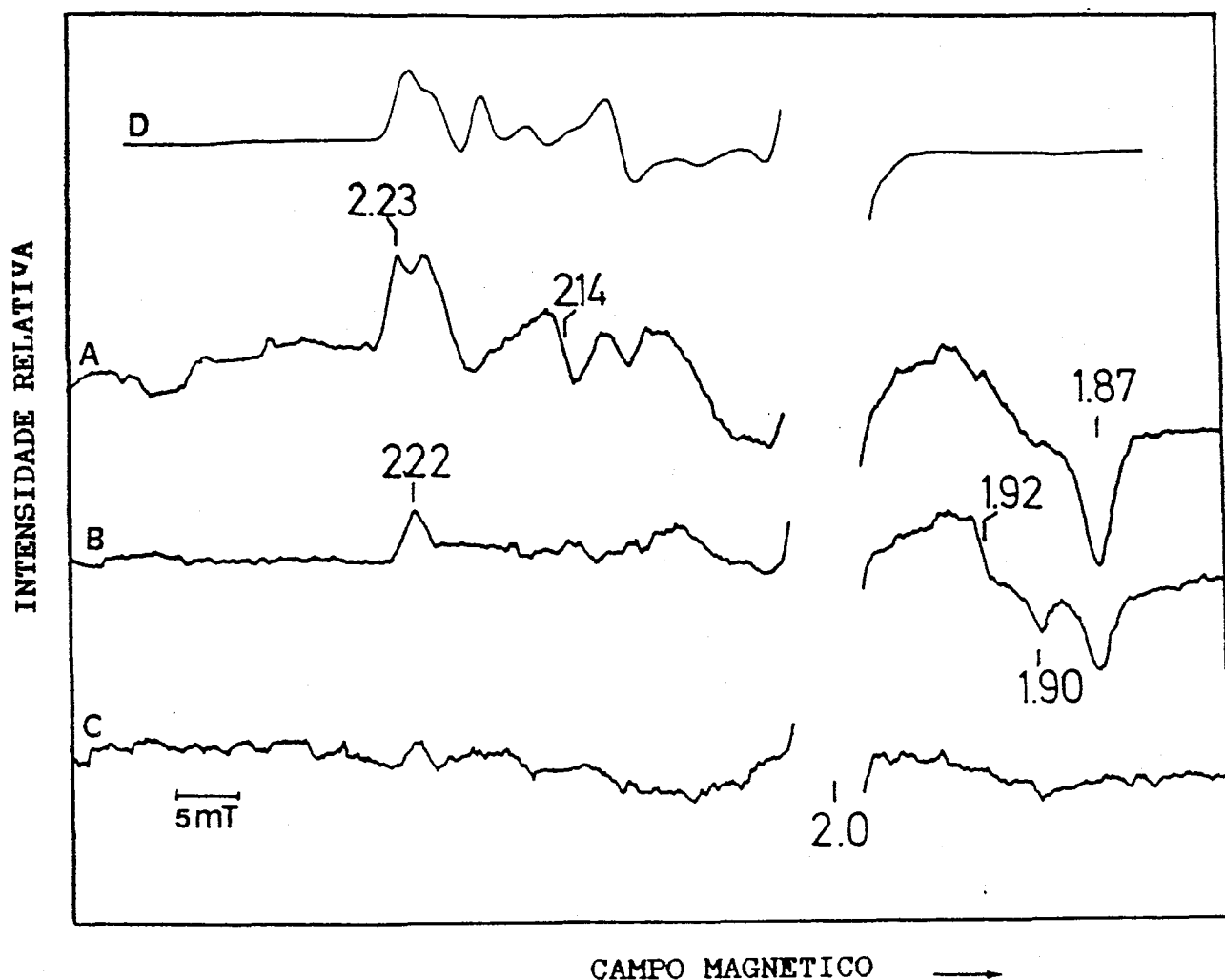


Figura VII.5: Sinais de RPE da hidrogenase de *D. salaxigens* reduzida sob hidrogênio, a -450 mV
 Temperatura: 4 K (A), 11 K (B) e 22 K (C)
 Outras condições como na Fig.VII.2
 D- Espectro da hidrogenase de *D. gigas* nas condições do espectro A

-sinais rômnicos típicos de centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ podendo distinguir-se pelo menos dois espectros de centros diferentes, centro I, possivelmente com valores de g a 2,04 , 1,92 e 1,90 e centro II também possivelmente com valores de g a 2,06 , 1,94 e 1,87. O centro I ($g_{\min} = 1,87$) apresenta relaxação electrónica

mais rápida que o centro II ($g_{\min} = 1,90$). É necessário a obtenção de amostras mais concentradas de modo a estudar com maior detalhe os sinais de RPE destes centros e, assim, decompor o espectro complexo em dois sinais rômnicos atribuíveis a cada centro [4Fe-4S].

Os sinais de RPE a $g=2,22$ e a $g=2,23$ apresentam intensidades bastante baixas, sugerindo que as espécies a eles correspondentes terão um carácter de intermediários no ciclo catalítico da enzima. Como se verá na alínea seguinte, os dados obtidos por titulação redox confirmam esta hipótese e indicam ainda que nos estados mais reduzidos atingidos ao valor de pH destas amostras (pH=7,6) os centros Fe/S não se encontram ainda totalmente reduzidos, o que, pelo menos em parte, pode explicar a igualmente fraca intensidade dos sinais destes centros reduzidos.

VII.4-Determinação de potenciais Redox

Foram determinados os potenciais de oxidação-redução da hidrogenase de *D. salaxigens* por titulação redox seguida por RPE, incubando a enzima a diferentes pressões parciais de hidrogénio na presença de mediadores redox (ver Apêndice), a pH=7,6. As diferentes propriedades de relaxação dos sinais de RPE desta enzima permitem determinar os perfis de intensidade em função do potencial redox efectuando medidas às temperaturas de 20 K (sinal a $g=2,22$) e 4 K (sinais a $g=2,23$ e a $g=1,94$). As curvas de titulação obtidas apresentam-se na figura VII.6. Verifica-se que os sinais a $g=2,22$ e a $g=2,23$ têm potenciais de redução ligeiramente diferentes. O sinal a $g=2,22$ aparece a potenciais infe-

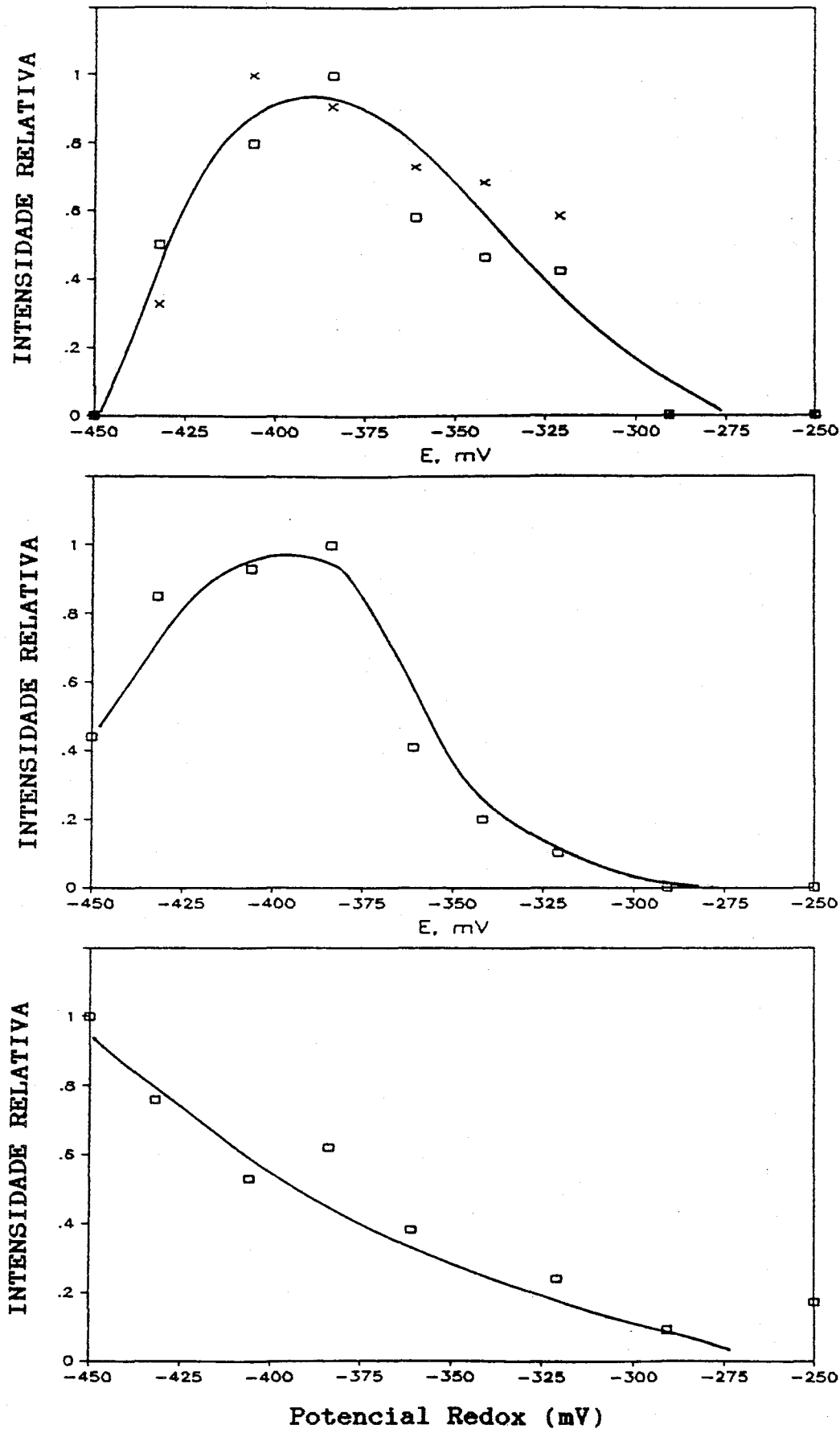


Figura VII.6: Titulação Redox da Hidrogenase de *D. sallexigens* Intensidade do sinal de RPE (unidades arbitrárias) a diferentes pressões parciais de hidrogênio e a pH 7,6, aos seguintes valores de g e temperaturas: A- $g=2,22$ (\square) e $2,16$ (\times) a 20 K; B- $g=2,23$ (\square) a 4 K; C- $g=1,87$ (\square) a 4 K

riores a - 300 mV , atinge um máximo de intensidade a cerca de - 380 mV e diminui de intensidade a potenciais mais negativos (ao valor de - 450 mV já não é detectado). E, pois, uma espécie com um comportamento de transiente. O sinal a $g=2,23$ surge a potenciais inferiores a -300 mV e atinge a intensidade máxima perto de -400 mV. Embora diminua de intensidade a potenciais mais baixos, é ainda detectável a -450 mV (cerca de 50% da intensidade máxima). Os sinais devidos aos centros ferro-enxofre formam-se a valores de potencial inferiores a -250 / -290 mV.

Os dados obtidos não permitem diferenciar os dois centros, mas indicam que ao potencial mais negativo atingido a pH=7,6 (-450 mV) os centros não se encontram ainda totalmente reduzidos, o que não permite determinar os valores de E'_0 destes centros. Contudo, os dados sugerem que pelo menos um dos centros terá um valor de E'_0 perto ou mesmo inferior a -450 mV, enquanto o outro centro poderá ter um valor mais positivo, a cerca de - 350 mV.

VII.5-Actividade Catalítica

A actividade catalítica da hidrogenase de *D.salexigens* foi estudada em colaboração com o grupo do Prof. J LeGall (Cadarache).

VII.5.1-Produção de H₂

A actividade catalítica da hidrogenase de *D.salexigens* foi determinada pela velocidade de evolução de H₂ usando ditionito de sódio como redutor e metil viologénio como mediador redox a 30 °C e a pH 7,6 , por cromatografia em fase gasosa (ver Apêndice).

Verificou-se que a enzima, no estado em que foi isolada, não apresenta uma fase de espera, sendo a velocidade de produção de hidrogénio praticamente constante desde o início do ensaio. A preparação da enzima utilizada tem uma actividade específica de $760 \text{ mol H}_2 \text{ produzido min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

VII.5.2-Permuta D_2/H^+

Estudou-se também a actividade catalítica da hidrogenase de *D.salexigens* na reacção de permuta D_2/H^+ a pH 7,6 utilizando uma mistura de 20% D_2 em N_2 . A cinética da reacção de permuta apresenta-se na figura VII.7.

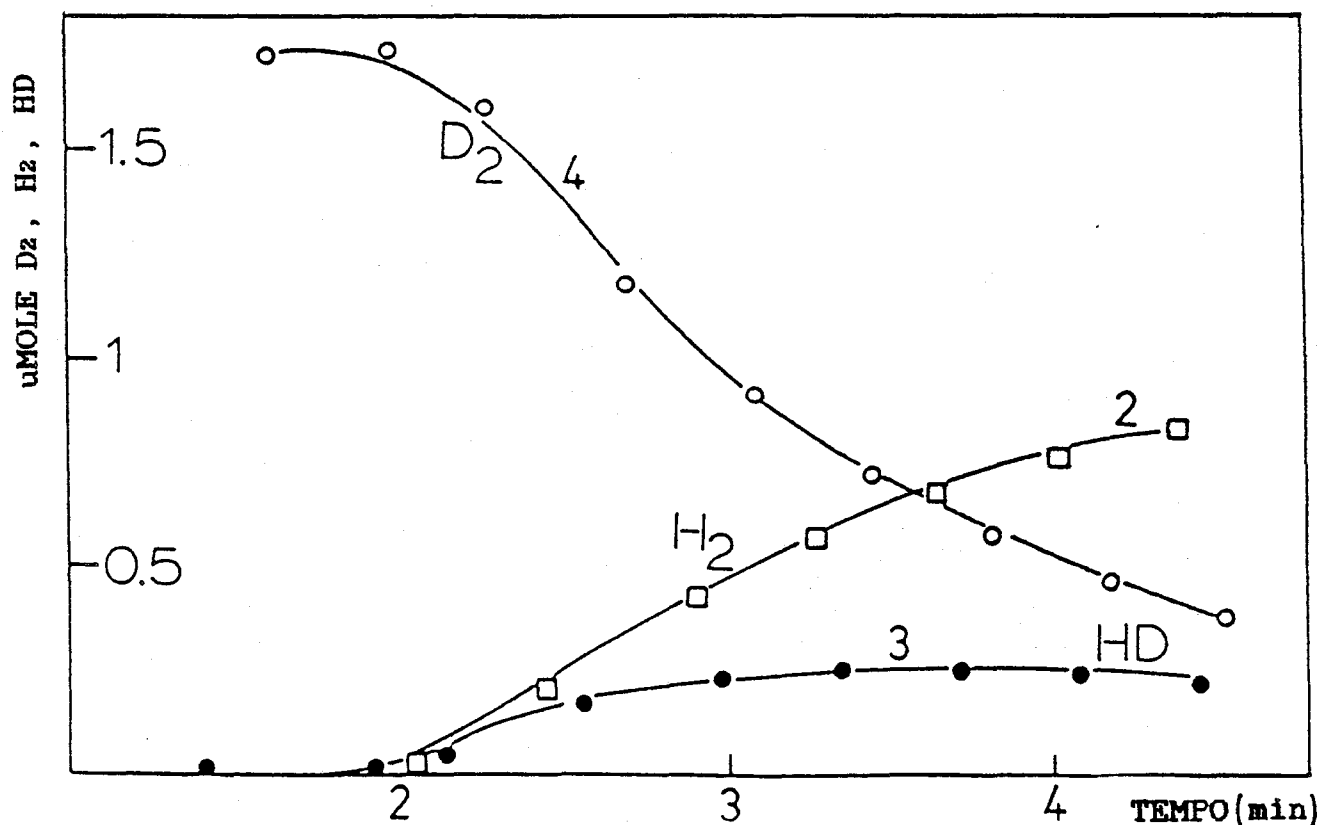


Figura VII.7: Cinética da reacção de permuta isotópica D_2/H^+ catalisada pela hidrogenase de *D.salexigens*, a pH 7,6 seguindo os picos de massa 4, 3 e 2, respectivamente (O) Consumo de D_2 , (●) Evolução transiente e consumo de HD , (□) Produção de H_2 . Concentração de proteína 0,6 nM; Fase gasosa- 20% D_2 em N_2 .

A razão das velocidades iniciais de evolução de H_2 e HD é maior que 1 a este valor de pH.

VII.6-Conclusão

As propriedades fisico-químicas da hidrogenase solúvel de *D.salexigens* encontram-se na tabela VII.4. Esta hidrogenase é uma proteína contendo Ni, Se e centros Fe/S, podendo ser classificada no grupo de Hidrogenases [NiFe].

Esta hidrogenase apresenta propriedades bastante semelhantes às das hidrogenases isoladas de *Desulfovibriones*, em particular de *D.baculatus* (estirpe 9974) e de *D.desulfuricans* (Norway 4) (6) em relação à composição dos centros activos e actividade catalítica (ausência de fase de espera na reacção de produção de hidrogénio e razão H_2/HD na reacção de permuta isotópica D_2/H^+).

TABELA VII.2 : Propriedades Fisico-Químicas da Hidrogenase de *D.salexigens*

Localização	Periplasma
Massa Molecular (kDa)	98,0
Subunidades (kDa)	62,0 ; 26,0
Metais (átomo-g/98,0 kDa)	
-Níquel	1
-Ferro	12-15
Selênio (átomo-g/98,0 kDa)	1
Centros Fe-S	+ (2) ^(a)
Actividade específica	
- Evolução ($\mu\text{mol } H_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	760
- Permuta D_2/H^+ (razão H_2/HD)	> 1

(a) Possivelmente dois centros do tipo $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/1+}$

O sinal de RPE observado no estado nativo a $g=2$, de fraca intensidade e detectável apenas a baixa temperatura, é semelhante aos sinais detectados em proteínas contendo centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$, no estado nativo, e que tem sido atribuído a uma pequena fracção de centros $[3Fe-xS]_{ox}$ formados por interconversão de centros $[4Fe-4S]^{2+}$ por oxidação. Porém, os dados de que se dispõe não permitem discutir esta hipótese, nem excluir a possibilidade da presença de um centro $[3Fe-xS]$ ou $[4Fe-4S]^{3+/2+}$ nesta enzima.

Os sinais de RPE a $g=2,22$ e a $g=2,23$ têm propriedades de relaxação, valores de g e um comportamento redox semelhantes aos observados para as hidrogenases de *D.gigas* e *D.baculatus* (este trabalho, Capítulos V e VI). Assim, o sinal a $g=2,22$ poderá resultar de uma espécie idêntica à correspondente ao sinal a $g=2,19$, $2,14$ e $2,02$ (Sinal Ni-C) da hidrogenase de *D.gigas*, enquanto o sinal a $g=2,21$ desta mesma enzima parece análogo ao sinal a $g=2,23$ da hidrogenase de *D.salexigens*.

No capítulo X serão discutidos estes dados, enquadrando-os num estudo comparativo das hidrogenases $[NiFe]$ de organismos redutores de sulfato do género *Desulfovibrio*.

VII.7-Referências

- 1- I.Moura, J.J.G.Moura, M.Bruschi and J.LeGall, (1980), Biochim.Biophys.Acta, 591, 1-8
- 2- H.Drucker, E.B.Trousil and L.L.Campbell, (1970), Biochimie, 9, 3395-3400
- 3- G.Fauque, M.Czechowski, N.Galliano and J.LeGall, (1985), resultados não publicados

- 4- M.Czechowski, G.Fauque, Y.Berlier, P.A.Lespinat and J.Legall, (1985), Rev. Port. Quim., 27, 196-197
- 5- M.Teixeira, I.Moura, G.Fauque, M.Czechowski, Y.Berlier, P.A.Lespinat, J.LeGall, A.V.Xavier and J.J.G.Moura, (1986), Biochimie, 68, 75-84
- 6- R.Rieder, R.Cammack and D.O.Hall, (1984), Eur. J. Biochem., 145, 637-643

CAPITULO VIII:
HIDROGENASE DE
METHANOSARCINA BARKERI
(DSM 800)

A bactéria *Methanosarcina barkeri* (DSM 800) é um organismo metanogénio bastante versátil do ponto de vista metabólico, podendo utilizar uma grande variedade de substratos ($H_2 + CO_2$, acetato, formato, metanol e diversas metilaminas) para a produção de metanol (1).

Neste capítulo descreve-se a purificação e a caracterização espectroscópica (RPE) de uma hidrogenase solúvel de *Ms. barkeri*.

VIII.1-Purificação da hidrogenase de *Ms.barkeri*

-Preparação do extracto bruto-

As células de *Ms.barkeri* foram crescidas a 37° C em metanol (2). No fim da fase de crescimento foram separadas por centrifugação e conservadas a -25° C. No início do processo de purificação, as células (1,9 Kg) foram suspensas em 800 ml de Tris/HCl 10 mM, adicionou-se DNase e romperam-se as células numa "French press" a 62 MPa sob atmosfera de azoto. O extracto foi centrifugado a 12.000 rpm durante 30 min, obtendo-se um volume total de extracto bruto de 2400 ml.

-Purificação-

A purificação foi realizada anaerobicamente, sob atmosfera de azoto. Separou-se o extracto bruto em duas partes iguais : uma adsorveu-se numa coluna de DEAE-52 (6x36 cm) e outra numa coluna de DEAE-BioGel A (6x34 cm), ambas equilibradas em Tris/HCl 10 mM. Após eluição com um gradiente contínuo de Tris/HCl 10-500 mM (500 ml de cada), verificou-se que a actividade hidrogenase se encontrava distribuída numa fracção membranar não adsorvida, contendo também citocromo b, e numa fracção solúvel eluída a baixa força

iônica (inferior a 200 mM). A fracção solúvel foi recolhida de ambas as colunas (volume total de 990 ml) e adsorvida numa coluna de hidroxilapatite (4,5x16 cm) equilibrada com Tris/HCL 200 mM. A fracção com actividade hidrogenase não se reteve nesta coluna, tendo sido concentrada por ultrafiltração num Diaflo (Amicon) com uma membrana YM-30. A fracção concentrada (130 ml) apresentava-se bastante turva, tendo sido centrifugada durante 40 min a 8.500 rpm. O precipitado, de cor acastanhada, foi recolhido e dissolvido suavemente sob azoto com Tris/HCl 300 mM. Centrifugou-se esta solução de novo a 8.500 rpm, durante 20 min, recolhendo-se a solução sobrenadante (4,7 ml). Esta última solução continha hidrogenase activa, com uma razão de absorvâncias A_{400}/A_{280} de 0,29 e numa concentração de 35 mg/ml. O esquema de purificação encontra-se na tabela VIII.1.

TABELA VIII.1: Purificação da Hidrogenase de *Methanosarcina barkeri* (DSM 800)

Fracção	Volume (ml)	Actividade Total (μ mol H ₂ /min)	Actividade Especifica (μ mol H ₂ /min.mg)	Rendimento %
Extracto bruto	2400	87024	0,49	100
DEAE-52 e DEAE-BioGel	990	57024	4,1	65,7
Hidroxilapa- tite	130	51103	16,6	58,7
Centrifuga- ção	4,7	39240	270	45,1

Posteriormente tentou-se a purificação aeróbica desta hidrogenase; esta purificação revelou-se bastante difícil, obtendo-se sempre quantidades muito pequenas de enzima com actividade

específica muito baixa e, aparentemente, com algumas características físico-químicas um pouco diferentes (ver adiante).

VIII.2-Caracterização Físico-Química

VIII.2.1-Massa Molecular

A massa molecular da hidrogenase de *Ms.barkeri* foi determinada por filtração em gel numa coluna de Sephadex G-200 (1x100 cm). Utilizaram-se os seguintes padrões: albumina (45 kDa), aldolase (158 kDa), catalase (240 kDa) e ferritina (450 kDa). O volume de eluição da enzima era muito semelhante ao volume de exclusão da coluna, pelo que não foi possível determinar com rigor a sua massa molecular. Contudo, utilizando-se a recta de calibração obtida com as proteínas padrão, foi obtido um valor, por extrapolação, de ≈ 800 kDa. Este valor é compatível com os resultados de electroforese em geis de poliacrilamida (7%): a proteína é retida no topo do gel, o que indica que a sua massa molecular tem um valor perto do limite de exclusão destes geis (1.000 kDa). Um valor semelhante foi obtido para a hidrogenase da bactéria *Methanobacterium*, estirpe G2R (massa molecular de cerca de 900 kDa) (3).

Por electroforese em geis de poliacrilamida na presença de SDS foi determinada a massa molecular das subunidades desta enzima. Usaram-se os seguintes padrões: tripsina (21 kDa), albumina (45 kDa), aldolase (158 kDa), catalase (240 kDa) e ferritina (450 kDa). Foram detectadas bandas correspondendo às seguintes massas moleculares: 50-70, 120-140 e 200 kDa. Estes resultados sugerem que a enzima é composta por subunidades de massa molecular mínima de cerca de 60 kDa. É possível que a elevada

massa molecular da proteína resulte de um forte estado de agregação, não traduzindo de facto a estrutura em subunidades da enzima. Em diversos organismos metanogénicos tem sido observada uma elevada hidrofobicidade nas hidrogenases, o que poderá explicar aquela agregação em solução aquosa (3,4).

VIII.2.2-Espectroscopia de visível e ultravioleta

A hidrogenase de *Ms.barkeri* tem uma cor castanho-dourado e apresenta um espectro de visível-ultravioleta típico de proteínas contendo centros Fe/S (Fig VIII.1).

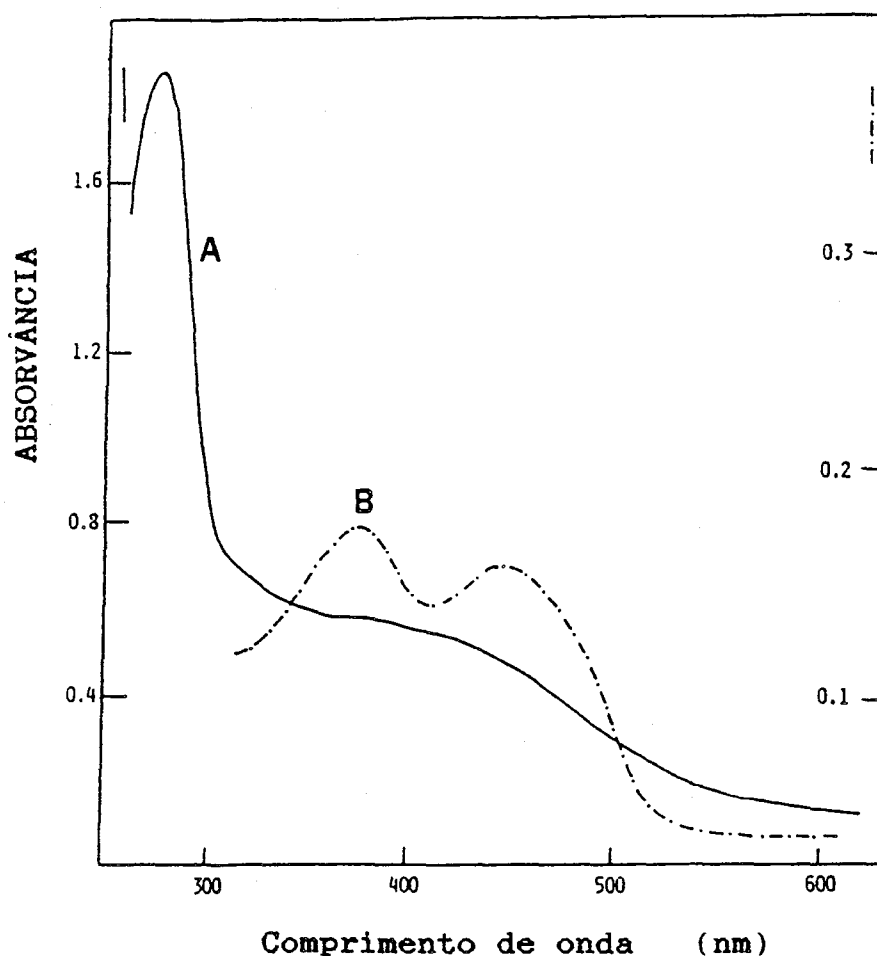


Figura VIII.1: Espectro de visível e ultravioleta de
A) Hidrogenase de *Ms.barkeri* (---). [Hase]=0,62mg/ml, tampão Tris/HCl 50 mM, pH=7,6.
B) Cromóforo libertado por tratamento com ácido Cl_3COOH (-·-·-·).

Observam-se bandas a 275 nm, 380 nm e um ombro alargado a 405 nm. A banda a 380 nm pode resultar de uma contribuição do grupo flavínico (ver adiante). A razão de absorvâncias A_{400}/A_{275} é de 0,29, um valor geralmente encontrado nas hidrogenases. Por redução sob hidrogênio verifica-se um decréscimo de 40 % da absorvância a 400 nm.

VIII.2.3-Extracção e identificação do grupo flavínico

Por precipitação da enzima com ácido tricloroacético (Cl_3COOH) a 8%, liberta-se da enzima um cromóforo fluorescente. O espectro de visível deste cromóforo apresenta-se na figura VIII.1-B. Observam-se bandas de absorção a 370 e 435 nm, a primeira das quais pode ser responsável pela banda a 380 nm encontrada no espectro da enzima nativa. Os espectros de emissão de fluorescência do cromóforo e da enzima nativa comparam-se na figura VIII.1. Verifica-se um enorme aumento de fluorescência a 520 nm por tratamento com aquele ácido. Os espectros de absorção no visível e de emissão de fluorescência do cromóforo são praticamente idênticos aos espectros dos grupos flavínicos FMN, FAD e riboflavina, sugerindo a sua semelhança a estes grupos.

Por cromatografia em camada fina tentou-se a identificação do cromóforo por comparação com padrões de FMN, FAD e riboflavina, usando os métodos descritos nas referências (5,6) (Tabela VIII.2). Os dados obtidos não permitem uma identificação inequívoca do cromóforo, nomeadamente a distinção entre um grupo FMN ou uma riboflavina.

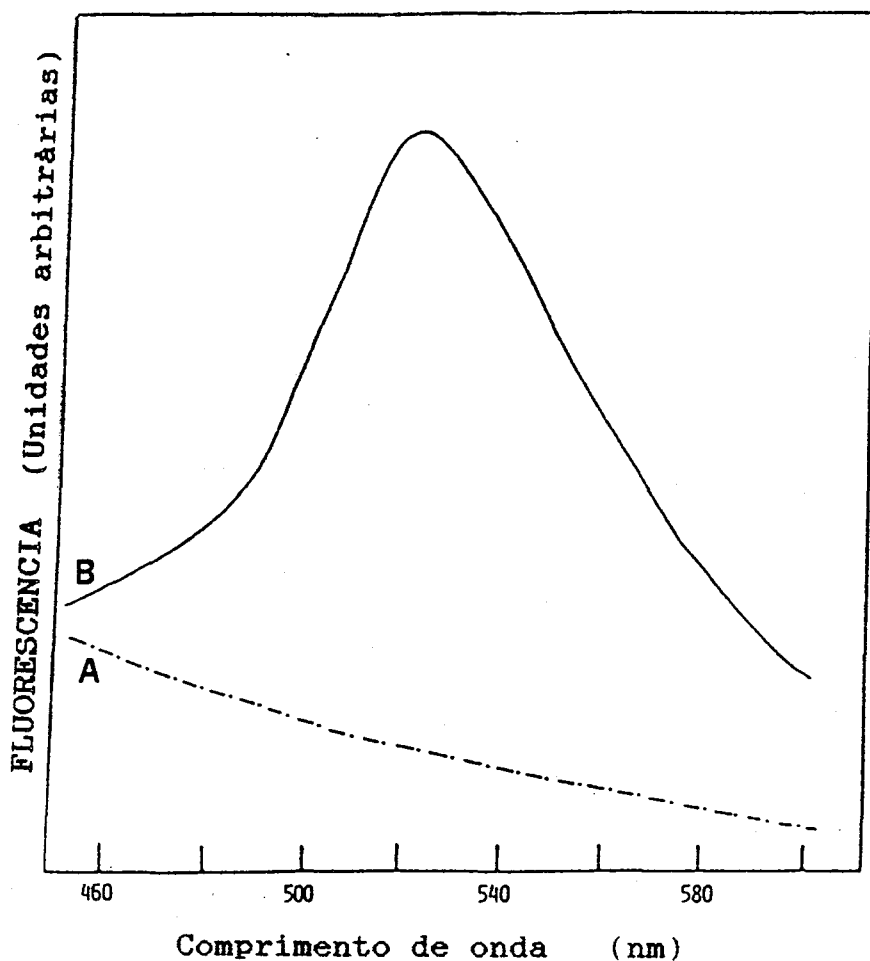


Figura VIII.2: Espectros de emissão de fluorescência de
A) Hidrogenase de *Ms. barkeri* nativa (---). [Hase]=1,2 mg/ml
B) Cromóforo extraído com ácido Cl_3COOH (—) a 8%.
Comprimento de onda de excitação : 400 nm.

TABELA VIII.2: Identificação do cromóforo flavínico
da hidrogenase de *Ms. barkeri*

Substância	Valor de R_f em placas de		
	Celulose no solvente A(a)	Silica no solvente B(a)	Silica no solvente B
FAD	45,9	4,9	7,3
FMN	53,5	16,2	16,6
Riboflavina	50,9	16,9	16,3
Cromofóro de <i>Ms. barkeri</i>	57,3	18	17,2

(a) Solventes : A- Na_2HPO_4 a 5% em água
B- n-butanol/ácido acético/água, 4:3:3

O teor em grupo flavínico na hidrogenase foi estimado por comparação das absorvâncias no visível dos cromóforos extraídos, em condições idênticas, da hidrogenase de *Ms. barkeri* e da flavodoxina de *Desulfovibrio gigas*, utilizando a absortividade molar desta última enzima (5). Verificou-se que a hidrogenase contém um grupo flavínico por subunidade de massa molecular mínima de 60 kDa.

VIII.2.4-Análise Química

Por análise espectrofotométrica (TPTZ) determinou-se o conteúdo em ferro desta enzima :8-10 átomo-g de Fe por massa molecular mínima de 60 kDa. Por espectrometria de absorção atômica obteve-se o teor em níquel: 0,6 - 0,8 átomo-g de Ni, também por 60 kDa.

VIII.3-Estudos de ressonância paramagnética electrónica do estado Nativo

Os espectros de RPE da hidrogenase de *Ms.barkeri* no estado nativo mostram-se na figura VIII.3. Observa-se um sinal rômico, com valores de g a 2,24 , 2,20 e ~2,0, detectado optimamente a cerca de 40 K (Figuras VIII.3 e VIII.4). A baixas temperaturas o sinal encontra-se saturado com a potência de microondas utilizada (2 mW), enquanto a temperaturas superiores a 40 K a velocidade de relaxação electrónica aumenta rapidamente, levando ao alargamento do sinal e à sua difícil detecção.

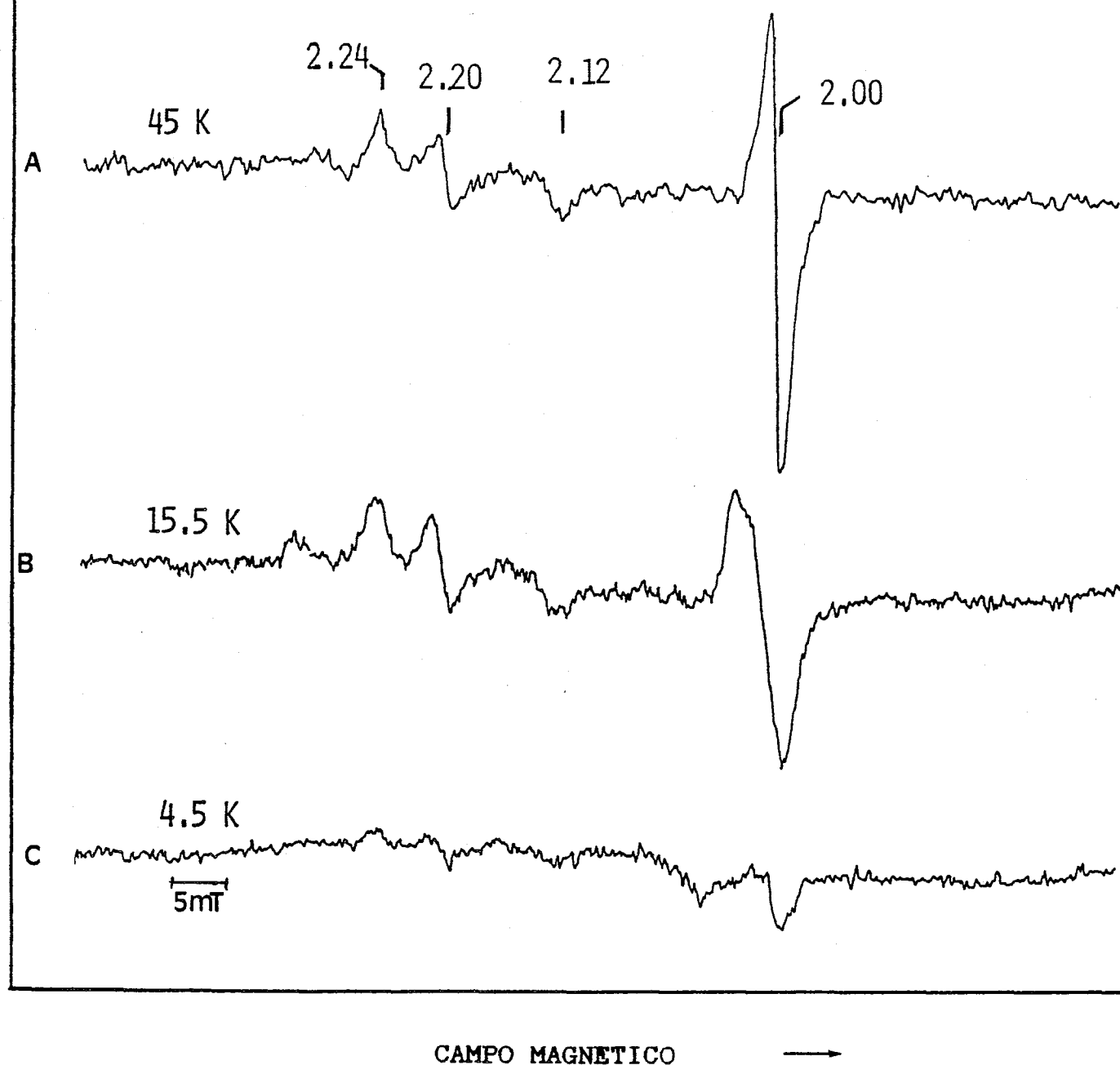


Figura VIII.3: Espectros de RPE da hidrogenase nativa de *Ms. barkeri*

Temperatura : A-45,4 K; B-15 K; C-4,5 K

Modulação : 1 mT; Potência : 2 mW

Frequência : 9,41 GHz; Ganho: 5×10^5

Atendendo á análise de metais desta enzima (apenas contém níquel e ferro), este sinal poderá ser atribuído a uma espécie paramagnética de níquel, possivelmente no estado de oxidação Ni(III), de baixo spin. Contudo, os valores de g deste sinal são diferentes dos geralmente detectados em outras hidrogenases [NiFe], embora semelhantes aos encontrados para diversos comple-

xos de iões Ni(III) com ligandos peptídicos (capítulo II), sugerindo uma coordenação do níquel na hidrogenase de *Ms.barkeri* diferente da coordenação naquelas enzimas.

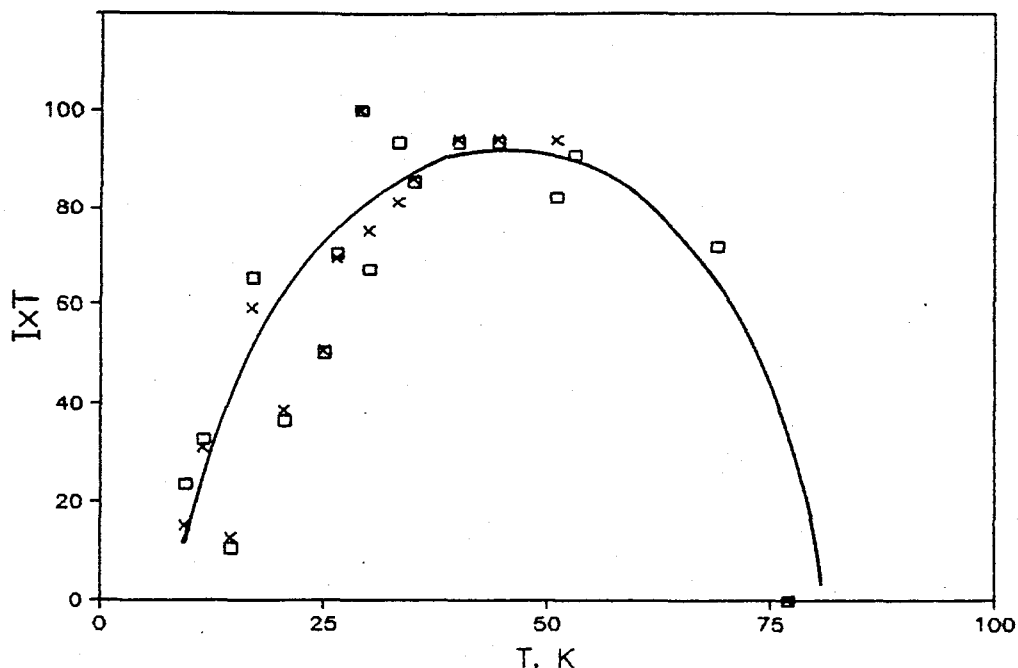


Figura VIII.4: Dependência com a temperatura da intensidade do sinal de RPE a $g=2,24$ (□) e a $g=2,20$ (X) da hidrogenase de *Ms.barkeri*. Potência da radiação de microondas: 2 mW

Por integração, a intensidade do sinal a $g=2,24$ corresponde a cerca de 10% do níquel detectado quimicamente, o que indica que a maior parte do níquel nesta hidrogenase se encontra numa forma silenciosa em RPE.

Nos espectros de RPE da hidrogenase de *Ms.barkeri* da figura VIII.3 detectam-se ainda dois outros sinais de RPE:

- uma componente com valores de g a 2,30 e 2,12, dificilmente observada. A intensidade desta componente aumenta ligeiramente por incubação da enzima sob oxigénio, o que sugere a possibilidade deste sinal corresponder a uma espécie de níquel (III)

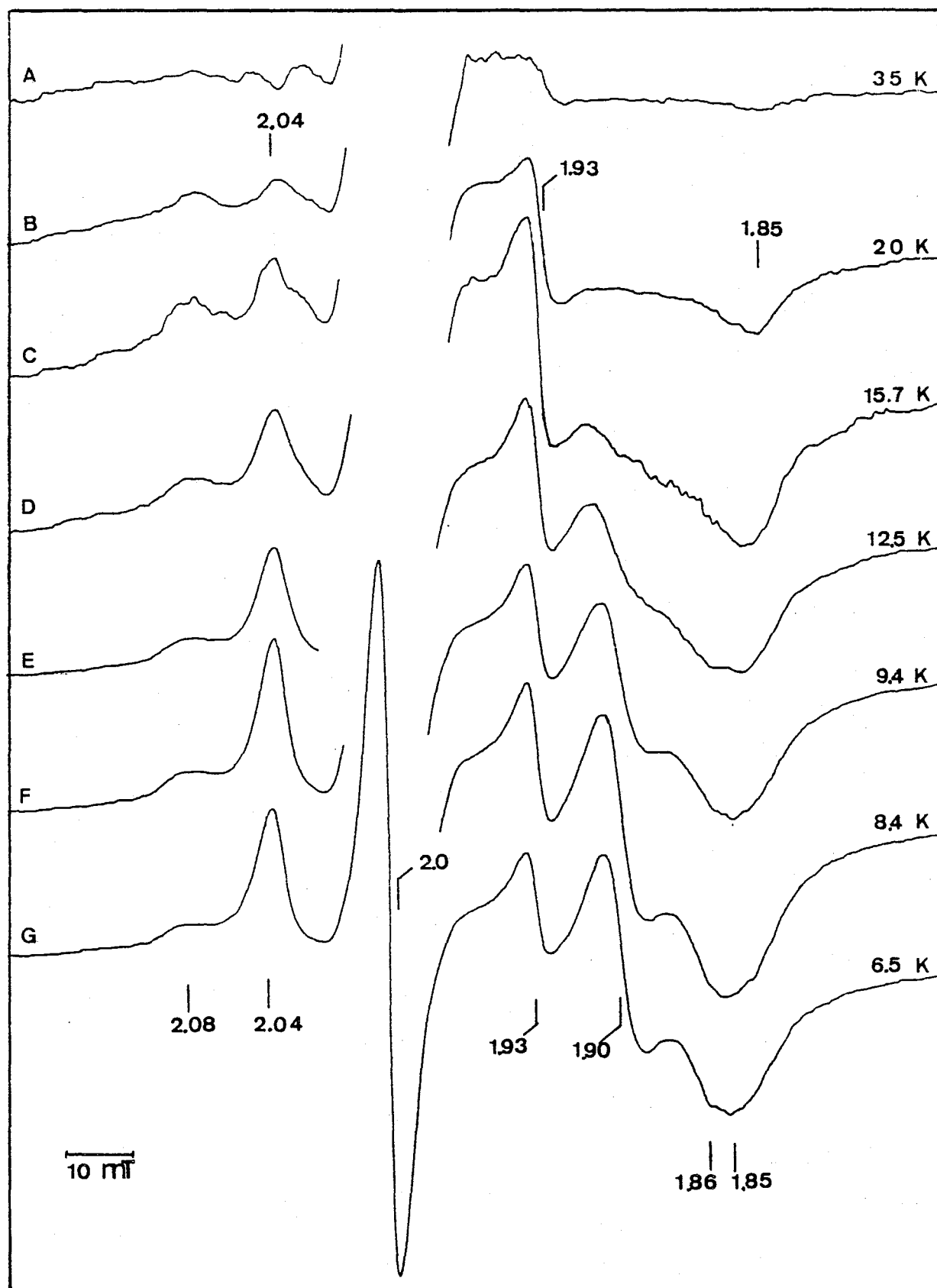
semelhante á encontrada , por exemplo, nas hidrogenases de *D.gigas* (sinal Ni-A ou Ni-B) ou de *D.baculatus* (membranar). Algumas preparações da hidrogenase de *Ms.barkeri*, purificada aerobicamente, apresentam sinais de RPE a cerca de $g=2,3$, $2,23$ e $\sim 2,0$, o que pode sugerir, de facto, a presença de espécies deste tipo ou, pelo contrário, a existência de diferentes tipos de hidrogenase neste organismo (ver adiante).

- Observa-se também um sinal isotrópico, a $g=2,00$, detectável particularmente a temperaturas elevadas (77 K). Não foi efectuada uma análise detalhada deste sinal. As suas propriedades de relaxação excluem a possibilidade do sinal resultar de um centro $[3Fe-xS]$ oxidado. A presença de um grupo flavínico nesta hidrogenase é compatível com a hipótese de o sinal a $g=2,00$ corresponder a um radical semiquinona, indicando que a enzima foi isolada numa forma parcialmente reduzida. Este facto estaria também de acordo com o baixo valor de intensidade do sinal de RPE atribuído a níquel.

VIII.4- Estudos de ressonância paramagnética electrónica de estados reduzidos

A hidrogenase de *Ms.barkeri* em estados parcial e totalmente reduzidos sob hidrogénio ou por adição de ditionito de sódio foi estudada por RPE. Quando a enzima é incubada sob hidrogénio por um tempo relativamente curto (Figura VIII.5), observa-se a baixa temperatura um sinal complexo com valores de g a $\sim 1,94$. Por estudos de variação de temperatura, é possível distinguir dois conjuntos de valores de g , correspondentes a dois tipos de centros Fe/S reduzidos: centro I, com valores de g a $2,04$, $1,90$ e $1,86$, e centro II com valores de g a $2,08$, $1,93$ e $1,95$.

INTENSIDADE RELATIVA



CAMPO MAGNETICO →

Figura VIII.5: Espectros de RPE da hidrogenase de *Ms. barkeri* parcialmente reduzida sob hidrogênio
 Temperatura e ganho: A-35 K, 2×10^5 ; B-20 K, 5×10^4 ;
 C- 15,7 K, 5×10^4 ; D- 12,5 K, $2,5 \times 10^4$; E- 9,4 K,
 $1,6 \times 10^4$; F- 8,4 K, $3,2 \times 10^4$; G-6,5 K, 2×10^4
 Amplitude de modulação: 1 mT; Frequência: 9,41 GHz
 Potência de microondas: 2 mW

Em estados mais reduzidos da enzima, sob hidrogénio ou por adição de ditionito de sódio (Figura VIII.6), verifica-se um aumento da intensidade do sinal a $g=2,04$, o que sugere uma ligeira diferença de potenciais redox de ambos os centros, tal como tem sido observado para outras hidrogenases [NiFe]. A intensidade total dos sinais a baixa temperatura na amostra mais reduzida com ditionito de sódio corresponde a 1,7-2 spin por massa molecular mínima de 60 kDa. Este valor é compatível com a presença de dois centros $[4Fe-4S]^{1+}$.

Para uma identificação do tipo de centro Fe/S foi preparada uma amostra de hidrogenase reduzida com ditionito de sódio na presença de dimetilsulfóxido a 80% (Figura VIII.6-F). Detecta-se um sinal de RPE quase axial, com valores de g a 2,08 e 1,93, observável até cerca de 30 K. Este resultado permite a identificação dos centros Fe/S como centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$, no estado de oxidação +1 nas amostras reduzidas, já que os centros $[2Fe-2S]^{1+}$ nestas condições são geralmente detectados até temperaturas perto de 77 K. Assim, de acordo com os resultados de análise química e de intensidade do espectro a baixa temperatura das amostras totalmente reduzidas, pode dizer-se que a enzima no estado reduzido contém dois centros $[4Fe-4S]^{1+}$.

Nos espectros de RPE das amostras de hidrogenase reduzida observam-se ainda outros sinais de RPE:

- um sinal isotrópico a $g=2,00$, intenso na amostra parcialmente reduzida, e não detectado nas amostras totalmente reduzidas. Como atrás foi referido, este sinal pode resultar da forma semiquinona do grupo flavínico; a sua não detecção nos estados mais reduzidos, dever-se-ia à formação da forma hidroquinona.

INTENSIDADE RELATIVA

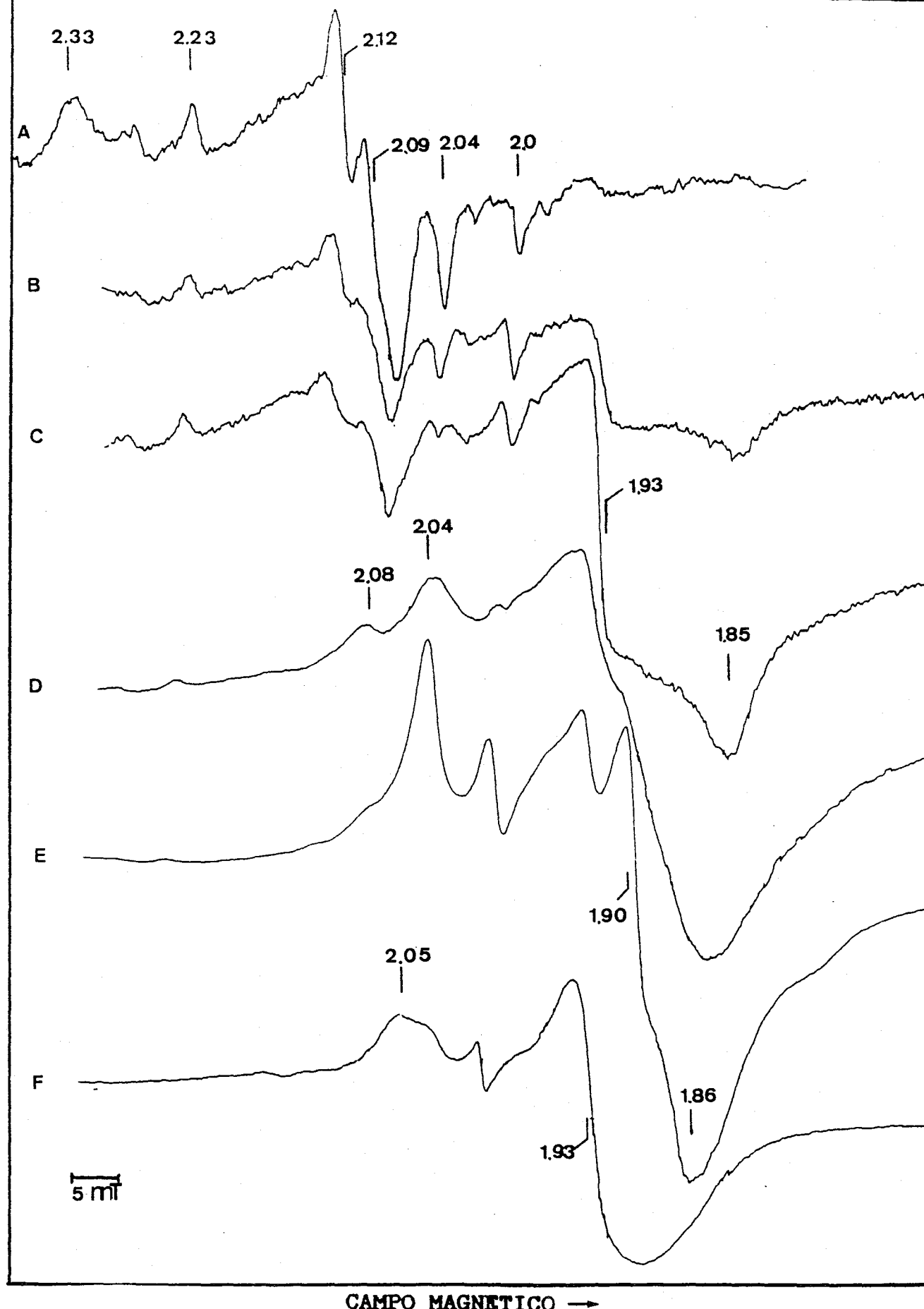


Figura VIII.6: Espectros de RPE da hidrogenase de *Ms.barkeri* reduzida : A-D, com excesso de ditonito de sódio; E- longo tempo de incubação sob hidrogênio; F- reduzida com ditonito de sódio na presença de DMSO a 80 % Temperatura e Ganho: A- 60 K, $3,2 \times 10^5$; B- 23 K, $3,2 \times 10^5$; C- 16 K, $2,5 \times 10^5$; D- 8,7 K, 5×10^4 ; E- 11 K, $3,2 \times 10^4$; F- 9,8 K, $6,2 \times 10^4$. Outras condições como na Fig.VIII.5

- a temperaturas superiores a 30 K revelam-se sinais complexos com valores de g a 2,33 , 2,23 , 2,12 , 2,09 , 2,04 e 2,00 , correspondendo provavelmente à sobreposição de dois sinais rômnicos. Estes sinais poderão resultar de múltiplas espécies de níquel, embora seja necessário um estudo detalhado destes sinais para a sua correcta identificação. As componentes a $g=2,33$ e 2,12 são também observadas em algumas amostras das hidrogenases de *D.baculatus* reduzidas (Capítulo VI).

VIII.5-Actividade catalítica

A actividade catalítica da hidrogenase de *Ms.barkeri* foi estudada por Fauque et al (1,7). A enzima apresenta, a pH 7,6 , uma actividade específica de produção de hidrogénio de 270 $\mu\text{mol H}_2 \text{ produzido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. A actividade máxima de produção de hidrogénio é obtida a pH=8 (Figura VIII.7) (1).

Lespinat et al (8) verificaram que na reacção de permuta D_2/H^+ a razão de velocidade de formação dos produtos de permuta H_2/HD era igual a cerca de 0,3 , a pH=7,6.

Sob hidrogénio, a hidrogenase de *Ms.barkeri* reduz o cofactor F_{420} livre ou ligado a proteína, isolado do mesmo organismo, e o citocromo c_3 tetrahémico de *D.gigas*, mas não reduz NAD ou NADP.

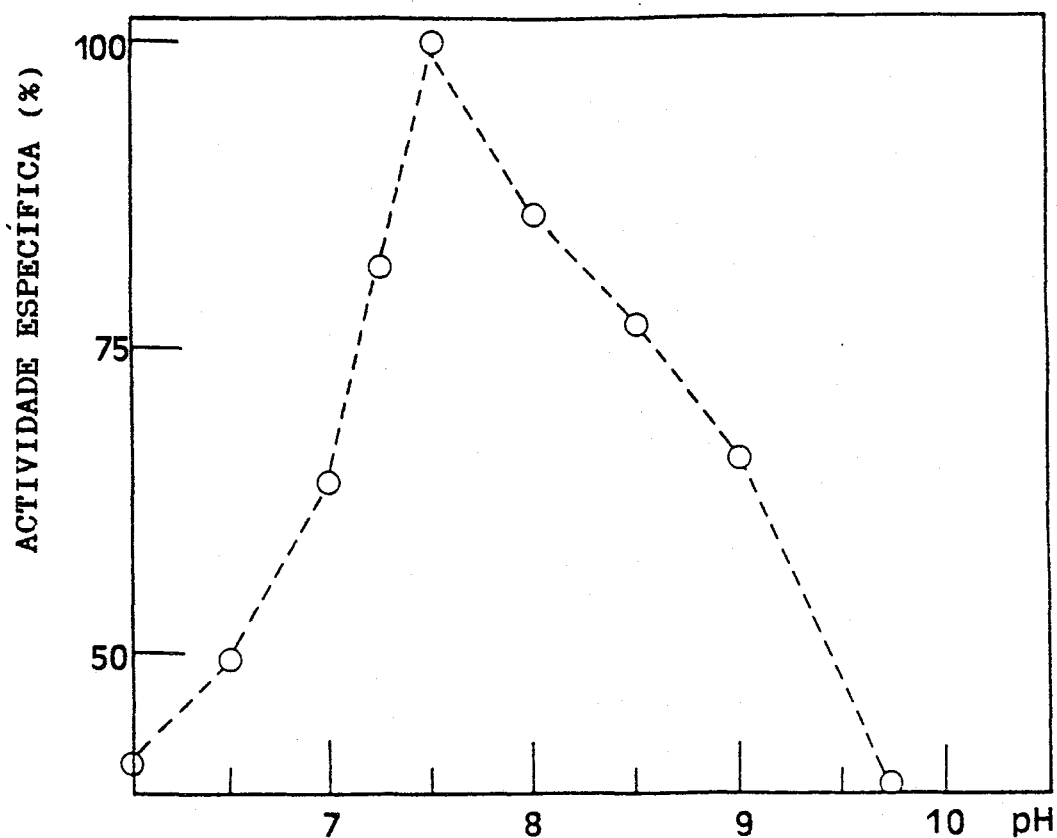


Figura VIII.7: Atividade de produção de hidrogênio da hidrogenase de *Ms.barkeri* em função do pH (1)

VIII.6-Conclusão

As características básicas de hidrogenases isoladas de organismos metanogênicos resumem-se na Tabela VIII.4.

Alguns destes organismos parecem conter mais de uma hidrogenase (*Mb.thermoautrophicum* (estirpe ΔH (9,10)) e *M.formicicum* (11,12)) de propriedades diferentes, em particular no que se refere à redução do cofactor F_{420} : uma reduz este cofactor sob hidrogênio, enquanto a outra não o reduz. Embora sejam necessários estudos detalhados que comprovem a existência de hidroge-

TABELA VIII.3: CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE HIDROGENASES ISOLADAS DE ORGANISMOS METANOGENICOS

Propriedade	<i>Mb.thermoautotrophicum</i> (ΔH) ^a (Marburg)			<i>Methanobacterium</i> (estirpe G2R)	<i>Mb.formicicum</i> (DSM 1535)		<i>Ms.barkeri</i> (DSM 800)
	I	II			I	II	
Massa Molecular (kDa)	170,0 ^a	--	60,0	~ 900	170	170	~ 800
subunidades (kDa)	5	2	--	3	n.r.	2	+ ^c
níquel	2	+	1	n.r.	3	1	1
ferro não hémico	33-43	+	n.r.	n.r.	20	10	8
-[3Fe-xS]	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.	+ ^b	n.d.
-[4Fe-4S]	+	+	n.d.	n.r.	n.r.	+	2
Flavina	(RPE) 2	(RPE) -	n.r.	n.r.	n.r.	(RPE) n.d.	1
Sinais de RPE							
oxidado							
- Ni(III)	2,31	2,24 2,02	2,31 2,23 2,01	n.r.	n.r.	2,29 2,23 2,01	2,24 2,12 2,0
reduzido							
- Ni	2,19 2,14	--	n.r.	n.d.	n.r.	(2,22 -- --)	
Redução de F ₄₂₀	+	-	+	n.r.	+	-	+
Act. especifica (μmoles H₂/min.mg)							
evolução	712	n.r.	300-480	n.r.	n.r.	50-70	270
consumo	n.r.	n.r.	530-720	n.r.	60	170	n.r.
Referência	(9)	(9)	(13)	(3)	(14)	(15)	(Este trabalho)

n.d.- não detectado ; n.r.- não referido na literatura

- : ausente ; + : presente (RPE)-evidência por RPE

c) Massa molecular mínima: 60 kDa

a) Isolada na forma de oligômero com Mm>500 kDa

b) Sinal de RPE isotrópico, de fraca intensidade

Teor em metais: átomo g por massa molecular mínima

nases de facto distintas nestes organismos, envolvendo por exemplo a determinação da sequência de aminoácidos e o estudo dos genes de cada enzima. A existência de formas distintas de hidrogenase pode ser particularmente relevante para o estabelecimento do metabolismo e bioenergética das bactérias metanogénicas, em particular para a comprovação da hipótese de reciclagem de hidrogénio que, tal como para as bactérias redutoras de sulfato, foi proposta como um mecanismo possível naqueles organismos (4). É também interessante verificar que apenas uma das hidrogenases tem revelado actividade na redução do cofactor F_{420} , apontado como o transportador electrónico central na metanogénese (4).

Os dados de massa molecular e composição em subunidades são ainda escassos, não sendo possível uma comparação detalhada. Verifica-se que algumas hidrogenases são isoladas em formas oligoméricas (*Ms.barkeri*, *Mb.thermoautotrophicum* (ΔH (9) e Marburg (10)) e *Methanobacterium*, estirpe G2R (3)), de elevada massa molecular (500-900 kDa), que podem traduzir um estado de agregação de moléculas de enzima, e que tem dificultado a determinação efectiva da estrutura em subunidades destas enzimas.

Aparentemente todas as hidrogenases de metanogenos contêm níquel e centros Fe/S (apenas para *Methanobacterium*, estirpe G2R, não se conhecem resultados). As hidrogenases redutoras de F_{420} possuem também um grupo flavínico, cuja presença, para a hidrogenases de *Mb.Formicicum*, se demonstrou ser essencial para a redução deste cofactor (14), o que pode sugerir uma relação entre a presença destes grupos e aquela actividade redutora. O centro de níquel nas hidrogenases nativas de *Mb.thermoautotrophicum* (ΔH (10) e Marburg (13)) e *Mb.formicicum* (14) é activo em RPE, reve-

lando sinais com valores de g a cerca de 2,3 , 2,23 e 2,0 , semelhantes aos sinais Ni-A e Ni-B da hidrogenase de *D.gigas*, tendo sido atribuido o estado de oxidação Ni(III) para este centro nas enzimas nativas. Em ambas as estirpes de *Mb.thermoautotrophicum* foram isoladas hidrogenases enriquecidas em ^{61}Ni (9,13), observando-se alargamento das linhas dos sinais de RPE a $g=2,31$ e 2,23 e estrutura hiperfina resolvida nas linhas a $g=2,01$, o que demonstrou inequivocamente a origem destes sinais de RPE em espécies paramagnéticas de níquel. O sinal de RPE detectado na hidrogenase nativa de *Ms.barkeri* apresenta valores de g e propriedades de relaxação diferentes (valores de g a 2,24 2,12 e 2,0). Contudo, os valores de g são semelhantes aos encontrados para diversos compostos de níquel(III) com ligandos peptídicos (Capítulo II), pelo que pode ser atribuido a um ião Ni(III) numa geometria octaédrica com distorção tetragonal, num campo forte ($S=1/2$). Em todos os casos, a intensidade dos sinais de níquel é bastante fraca, 10-20% do níquel detectado quimicamente, indicando que a maioria dos centros de níquel se encontram numa forma silenciosa em RPE.

No estado nativo não têm sido observados sinais de RPE que possam ser atribuidos a centros $[3\text{Fe}-x\text{S}]$ oxidados, com a excepção da hidrogenase de *Mb.formicicum* (15), que apresenta um sinal isotrópico a $g=2,01$, detectável a baixas temperaturas, mas quantificando apenas cerca de 0,05 spin/mol. Por espectroscopia de MCD do estado nativo da hidrogenase de *Mb.thermoautotrophicum* (estirpe ΔH) verificou-se também a ausência deste tipo de centro (16). Estes dados podem sugerir que todas estas hidrogenases não

contêm centros Fe/S deste tipo.

Nos estados reduzidos sob hidrogénio ou com ditionito de sódio destas hidrogenases têm sido detectados a baixa temperatura sinais de RPE com valores de g a $\sim 1,94$, atribuídos a centros $[4Fe-4S]$ reduzidos. Apenas para a hidrogenase de *Mb.barkeri* foi possível a identificação de dois sinais distintos, devidos a dois centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ no estado reduzido $+1$. Para as hidrogenases de *Mb.thermoautotrophicum* (estirpe ΔH) redutora de F_{420} (9) e de *Mb.barkeri* foram detectados sinais a $g=2,00$ em estados intermediários de redução, atribuídos a radicais semiquinona dos grupos flavínicos destas hidrogenases. Também nestas hidrogenases foram observados sinais de RPE rômnicos nos estados reduzidos, possivelmente devidos a espécies de níquel; o sinal de RPE da hidrogenase de *Mb.thermoautotrophicum* (9) tem valores de g semelhantes aos do sinal Ni-C da hidrogenase de *D.gigas* (valores de g a 2,19 , 2,14 e 2,01) e um comportamento redox também análogo ao deste sinal (é observado apenas em estados intermediários de redução).

Apenas para a hidrogenase de *Mb.formicicum* não redutora de F_{420} (15) foram determinados potenciais redox associados aos sinais de RPE detectados no estado nativo: o sinal de níquel desaparece num processo redox monoelectrónico com um valor de $E'_0 = -400$ mV, a $pH=8$, um valor bastante mais negativo que o observado para os sinais de níquel das hidrogenases de *D.gigas* e *Ch.vinosum* (17) e, ao contrário do verificado para estas enzimas, o processo não é reversível por reoxidação, isto é, o sinal de níquel, após redução da enzima, não reaparece; o sinal isotrópico a $g=2,02$, atribuído a um centro $[3Fe-xS]$, apresenta um valor de

$E'_0 = -75$ mV, da ordem de grandeza dos valores geralmente encontrados para este tipo de centro.

As hidrogenases de *Mb.thermoautotrophicum* (9,10), *Mb.formicicum* (14,15) e *Methanobacterium* (estirpe G2R) 93) são inactivas no estado em que são isoladas, necessitando de uma fase de activação sob hidrogénio ou com ditionito de sódio, tal como foi verificado para as hidrogenases de bactérias redutoras de sulfato. Para a hidrogenase de *Mb.formicicum* (15) a actividade parece estar dependente de um processo redox a potenciais inferiores a -400 mV, ou seja, ocorre a potenciais semelhantes aos associados ao desaparecimento do sinal de níquel presente no estado nativo desta hidrogenase.

Para as hidrogenases de *Mb.thermoautotrophicum* (estirpe ΔH) foram realizados estudos de EXAFS e de espectroscopia de Spin Eco (9,10,18). Os dados de EXAFS indicam que o ião níquel está coordenado essencialmente a átomos de enxofre, a uma distância de cerca de 0,23 nm, e numa geometria octaédrica com distorção tetragonal ou pirâmide quadrangular, ou seja, numa geometria semelhante à encontrada também por EXAFS para a hidrogenase de *D.gigas* (19). Este facto sugere uma semelhança entre os centros de níquel destas enzimas, de acordo com os dados de RPE. Por espectroscopia de Spin Eco verificou-se que o ião níquel da hidrogenase redutora de F_{420} está possivelmente ligado a um átomo de azoto, que os autores propõem pertencer ao grupo flavínico, enquanto para a outra hidrogenase deste organismo não se detecta esta ligação.

Por último é de referir que na hidrogenase de *Mb.formicicum* não redutora de F_{420} (15) foi detectada a presença de cobre

e zinco. Por reoxidação desta hidrogenase observa-se um sinal de RPE típico de Cu(II) ($E'_0 = 0$ mV). A função destes dois metais é ainda desconhecida.

Como conclusão pode dizer-se que as hidrogenases de bactérias metanogénicas até agora caracterizadas contêm níquel e centros Fe/S, possivelmente do tipo $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$, e, em alguns casos, grupos flavínicos. As propriedades de activação destas hidrogenases parecem semelhantes às das bactérias redutoras de sulfato: é necessária uma fase de activação redutora para que a actividade máxima de produção de hidrogénio por estas enzimas seja atingida.

VIII.7-Referências

- 1) G.Fauque, (1985), Thèse de Doctorat, Univ. de Compiègne, France
- 2) B.A.Blaylock and T.C.Stadtman, (1966), Arch.Biochem. Biophys., 67, 138-158
- 3) R.C.McKellar and G.D.Sprott, (1979), J.Bacteriol., 139, 231-238
- 4) L.Daniels, R.Sparling and G.D.Sprott, (1984), Biochim. Biophys. Acta, 768, 113-163
- 5) M.Dubordieu and J.LeGall, (1970), Biochem.Biophys.Res. Commun., 38, 965-972
- 6) K.Schneider, R.Cammack, H.G.Schlegel and D.O.Hall, (1974), Biochim.Biophys.Acta, 578, 445-461
- 7) G.Fauque, M.Teixeira, I.Moura, P.A.Lespinat, A.V.Xavier, D.V.DerVartanian, H.D.Peck, Jr., J.LeGall and J.J.G.Moura, (1984),

Eur.J.Biochem., 142, 21-28

8) P.A.Lespinat, Y.Berlier, G.Fauque, M.H.Czechowski, B.Dimon and J.LeGall, (1986), Biochimie, 68, 55-61

9) N.Kojima, J.A.Fox, R.P.Hausinger, L.Daniels, W.H.Orme-Johnson and C.T.Walsh, (1983), Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 80, 378-382

10) F.S.Jacobson, L.Daniels, J.A.Fox, C.T.Walsh and W.H.Orme-Johnson, (1982), J.Biol.Chem., 257, 3385-3388

11) M.J.K.Nelson, D.P.Brown and J.G.Ferry, (1984), Biochem. Biophys.Res.Comm., 120, 775-781

12) G.Fuchs, J.Moll, P.Schere and R.Thauer, (1979), in "Hydrogenases: Their Catalytic Activity, Structure and Function", ed. H.G.Schlegel and K.Schneider, E.Göltz KG, Göttingen, pp. 83-92

13) E.G.Graf and R.K.Thauer, (1981), FEBS Lett., 136, 165-169

14) R.K.Thauer, G.Diekert and P.Schönheit, (1980), Trends. Biochem. Sci., 11, 304-306

15) M.W.W.Adams, S.L.C.Jin, J.S.Chen and L.E.Mortenson, (1986), BiochimBiophys.Acta, 869, 37-47

16) M.K.Johnson, I.C.Zambrano, M.H.Czechowski, H.D.Peck, Jr., D.V.DerVartanian and J.LeGall, (1986), in "Frontiers in Bioinorganic Chemistry", Ed. A.V.Xavier, VCH, pp. 36-44

17) J.W. van der Zwaan, S.P.J.Albracht, R.D.Fontijn and E.C.Slater, (1985), FEBS Lett., 179, 271-277

18) P.A.Lindahl, N.Kojima, R.P.Hausinger, J.A.Fox, B.K.Teo, C.T.Walsh and W.H.Orme-Johnson, (1984), J.Am.Chem.Soc., 106, 3062-3064

19) S.L.Tan, J.A.Fox, N.Kojima, C.T.Walsh and W.H.Orme-Johnson, (1984), J.Am.Chem.Soc., 106, 3064-3066

20) A.Scott, S.Wallin, M.H.Czechowski, D.V.DerVartanian,
J.LeGall, H.D.Peck, Jr and I.Moura, (1984), J.Am.chem.Soc., 106,
6864-6865

CAPITULO IX:
HIDROGENASE DE
DESULFOVIBRIO DESULFURICANS
(ATCC 27774)

A hidrogenase de *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774) foi estudada essencialmente por H.J.Krüger et al (1,2), na Universidade da Georgia. Devido ao grande interesse destes estudos, tendo em conta a semelhança entre esta enzima e a hidrogenase de *D.gigas*, os dados obtidos para a hidrogenase de *D. desulfuricans* (ATCC 27774) serão apresentados de um forma sucinta.

O organismo redutor de sulfato *D.desulfuricans* (ATCC 27774) tem uma característica única entre as bactérias do género *Desulfovibrio*: pode utilizar sulfato ou nitrato como aceitante terminal de electrões (3). A redução de nitrato é efectuada apenas até amónia, ao contrário dos organismos desnitrificantes, que reduzem nitrato a azoto. As células de *D.desulfuricans* (ATCC 27774) crescidas em nitrato contêm os mesmos níveis de enzimas associadas à redução dissimilativa de sulfato, para além de apresentarem níveis elevados de enzimas associadas à redução de nitrato: nitrato reductase e nitrito reductase, ambas ligadas à membrana. A primeira destas enzimas não é encontrada nas células crescidas em sulfato, indicando que o metabolismo de nitrato é indutível neste organismo. A redução de nitrato está associada à transdução de energia. A hidrogenase deste organismo é periplásmica, desempenhando um importante papel na redução de nitrito a amónia (4).

IX.1- Características Fisico-químicas

Foram isoladas anaeróbicamente, sob atmosfera inerte, duas fracções de hidrogenase de *D.desulfuricans* (ATCC 27774), crescida em nitrato, designadas por Hidrogenase I e Hidrogenase II. As

hidrogenases têm massas moleculares semelhantes - 77,6 kDa e 75,5 kDa para as hidrogenases I e II, respectivamente. São compostas por duas cadeias polipeptídicas (de massas moleculares de 26,2 e 58,2 kDa) com idêntica composição em aminoácidos. A hidrogenase II tem uma actividade específica de produção de hidrogénio ($152 \mu\text{mol H}_2 \text{ produzido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) superior á da hidrogenase I ($97 \mu\text{mol H}_2 \text{ produzido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$).

A hidrogenase I contém 8,7 átomo-g de ferro, 6,8 átomo-g de enxofre lábil e 0,7 átomo-g de níquel por mole de enzima. A hidrogenase II contém 10,4 átomo-g de ferro, 11,4 átomo-g de enxofre lábil e 0,7 átomo-g de níquel por mole de enzima.

A semelhança de características espectroscópicas (RPE e Mössbauer) e de composição em aminoácidos destas duas fracções de hidrogenase sugere uma identidade de grupos prostéticos; a diferença de conteúdo em metais pode indicar que a fracção I contém enzima degradada, pelo que o teor em metais de ambas as enzimas deverá ser de 11 átomo-g de ferro, 11 átomo-g de enxofre lábil e 1 átomo-g de níquel por mole de enzima (1,2).

O espectro de visível e ultravioleta destas hidrogenases no estado oxidado apresenta um ombro mal definido a 400 nm ($\epsilon_{400} = 43,2 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e um pico a 280 nm, sendo típico de proteínas contendo centros Fe/S. A razão de absorvâncias A_{400} / A_{280} é de 0,29. Por redução sob hidrogénio a absorvância a 400 nm decresce de cerca de 25 % (2).

Nas alíneas seguintes serão apresentados resultados apenas para a hidrogenase de maior actividade específica (Hidrogenase II). As suas propriedades físico-químicas básicas resumem-se na Tabela IX.1.

TABELA IX.1: Propriedades fisico-químicas da
Hidrogenase II de *D.desulfuricans* (1,2)

Massa molecular (kDa)	75,5
Subunidades (kDa)	1 x 58,2 1 x 26,2
- Fe (átomo-g/mole)	11
- Ni (átomo-g/mole)	1
- S* (átomo-g/mole)	11
Espectro de Visível/UV (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	
ε- 400 nm	43,2
ε- 280 nm	149
A400 / A280	0,29

IX.2- Caracterização espectroscópica do estado nativo- RPE e Mössbauer

A hidrogenase de *D.desulfuricans* no estado nativo exibe um intenso sinal de RPE praticamente isotrópico centrado a $g=2,02$ ($g=2,024$, $2,02$ e $2,013$), observável a temperaturas inferiores a 20 K (1,2) (Figura IX.1-B). Este sinal é idêntico ao observado na hidrogenase nativa de *D.gigas*. Neste espectro observa-se ainda um pequeno sinal a $g=2$, de origem desconhecida, detectável também em algumas amostras da hidrogenase de *D.gigas*. Albracht *et al* observaram um sinal semelhante a este na hidrogenase nativa de *Ch.vinorum*, atribuindo-o a um sistema de acoplamento de spin entre um centro [4Fe-4S] paramagnético ($S=1/2$) e um centro de Ni(III) ($S=1/2$) (5). A temperaturas superiores a 77 K o espectro de RPE é dominado por um sinal rômico, com valores de g a $2,33$, $2,16$ e $2,02$ (Figura IX.1-B). Este sinal é detectável a baixas temperaturas mas, tendo características de relaxação electrónica lenta, encontra-se saturado nessas condições ao valor de potência de microondas utilizado (2 mW).

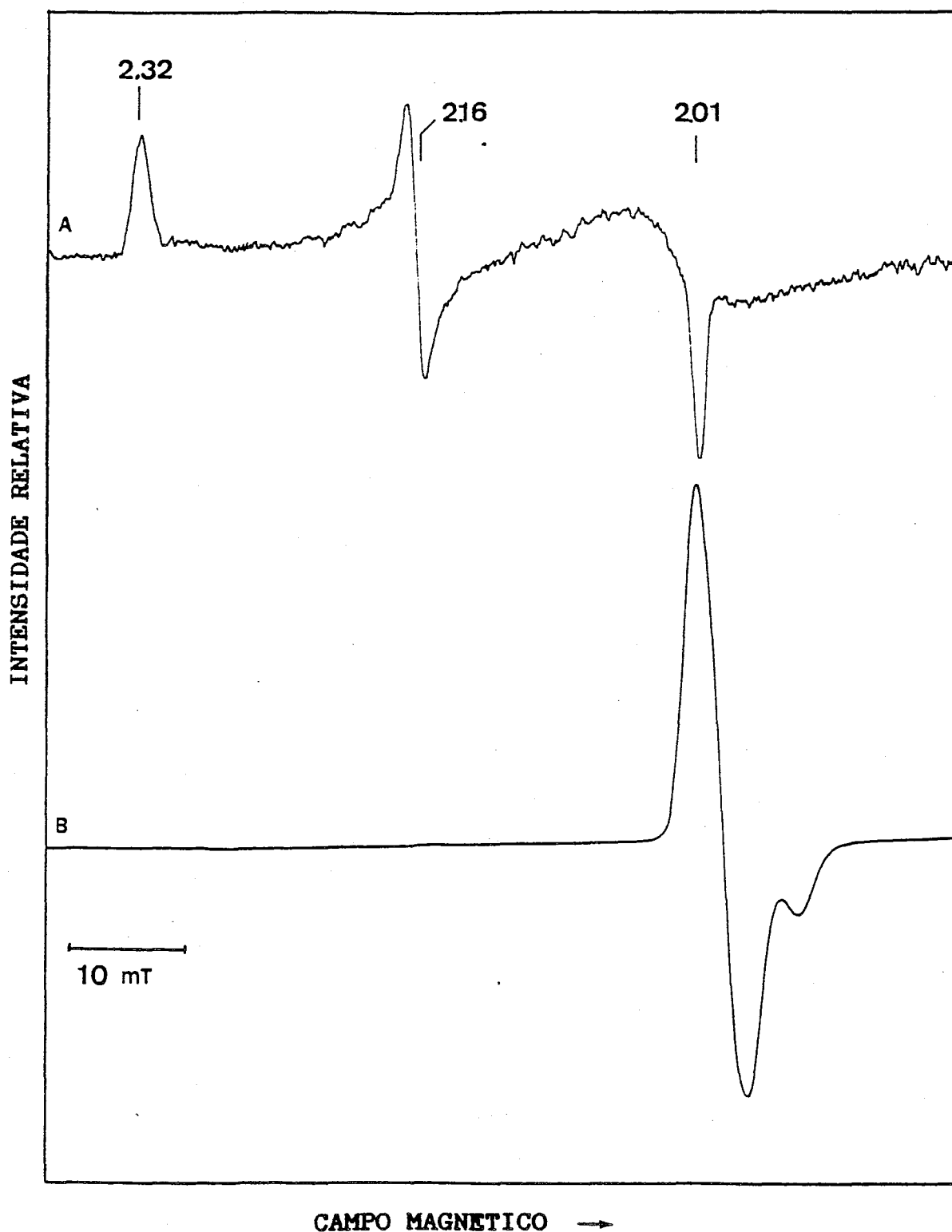


Figura IX.1: Espectros de RPE da hidrogenase nativa de *D. desulfuricans*

Temperatura : 77 K (A) e 4 K (B)
 Amplitude de modulação: 1 mT; Frequência
 da radiação de microondas: 9,28 GHz(A) e
 9,41 GHz(B); Potência de microondas : 2 mW

IX.2.1-Centros Fe/S: Identificação do sinal isotrópico

O sinal de RPE isotrópico da hidrogenase II isolada de células crescidas em meio enriquecido no isótopo ^{57}Fe ($I=1/2$) apresenta uma largura de linha de 3,2 mT, superior à observada para a hidrogenase em abundância natural de ^{57}Fe (2,1 mT), detectando-se mesmo alguma estrutura hiperfina, com uma constante de acoplamento hiperfino de cerca de 1,3 mT (1). Estes dados indicam que o sinal isotrópico a $g=2,02$ tem origem num centro contendo ferro (1).

O espectro de Mössbauer da hidrogenase enriquecida em ^{57}Fe , traçado a baixa temperatura, apresenta duas componentes subespectrais: um intenso dobleto de quadrupolo, correspondente a 70-80% da absorção total, e uma componente magnética entre -2 e +3 mm/s. O dobleto de quadrupolo tem parâmetros (desdobramento de quadrupolo, $E_Q=1,17$ mm/s, e desvio isomérico, $\delta=0,43$ mm/s) típicos de centros $[\text{4Fe-4S}]^{2+/1+}$ no estado de oxidação +2. De acordo com os valores da análise química, pode concluir-se que esta hidrogenase contém dois centros $[\text{4Fe-4S}]^{2+/1+}$, oxidados no estado nativo da enzima (1).

A componente magnética tem um padrão de absorção fortemente dependente da direcção do campo magnético aplicado, o que indica que deve estar associada a um intenso sinal de RPE, identificado como o sinal isotrópico a $g=2,02$. Uma análise detalhada desta componente, idêntica à descrita para a hidrogenase de *D.gigas*, revelou que este espectro de Mössbauer e o sinal de RPE a $g=2,02$ correspondem a um centro $[\text{3Fe-xS}]$ oxidado, com $E_Q=0,36$ mm/s e $\delta=0,36$ mm/s (1).

Como conclusão, pode dizer-se que a hidrogenase de *D.*

desulfuricans no estado nativo contém dois centros $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/1+}$ e um centro $[3\text{Fe}-\text{xS}]$, todos oxidados.

IX.2.2-Identificação do sinal de RPE rômboico

O espectro de RPE a 77 K da hidrogenase de *D.desulfuricans*, isolada de células crescidas em meio enriquecido em ^{61}Ni ($I=3/2$) e em ^{57}Fe ($I=1/2$) mostra um alargamento significativo das linhas a $g=2,33$ e $g=2,16$ e revela estrutura hiperfina na região de $g=2,01$. As duas linhas extremas nesta região estão afastadas de 8 mT. Devido às características do espectro de Mössbauer este alargamento não pode ser devido aos iões ferro (^{57}Fe), pelo que este resultado permite identificar inequivocamente o sinal rômboico como resultante de uma espécie paramagnética de níquel.

As características deste sinal de RPE são muito semelhantes às do Sinal Ni-B (valores de g a 2,33, 2,16 e 2,02) detectado na hidrogenase nativa de *D.gigas*, ou após ciclos de redução/oxidação anaeróbica desta enzima. Pelas razões apontadas nos capítulos anteriores, este sinal pode atribuir-se a um ião níquel(III) numa geometria octaédrica com distorção tetragonal, num campo de ligandos forte (sistema d^7 de baixo spin, $S=1/2$).

Em algumas amostras da hidrogenase de *D.desulfuricans* nativa são detectadas componentes adicionais no espectro de RPE, com valores de g a 2,23 e a cerca de 2,32 (1). Comparando com os sinais observados na hidrogenase de *D.gigas*, esta componente adicional parece corresponder ao Sinal Ni-A (valores de g a 2,31, 2,23 e 2,02) desta enzima.

IX.3-Estados intermediários de redução gerados sob hidrogénio

Na figura IX.2 mostra-se uma sequência de espectros de RPE

a 77 K da hidrogenase de *D.desulfuricans*, obtidos aos fim de tempos crescentes de incubação sob hidrogênio.

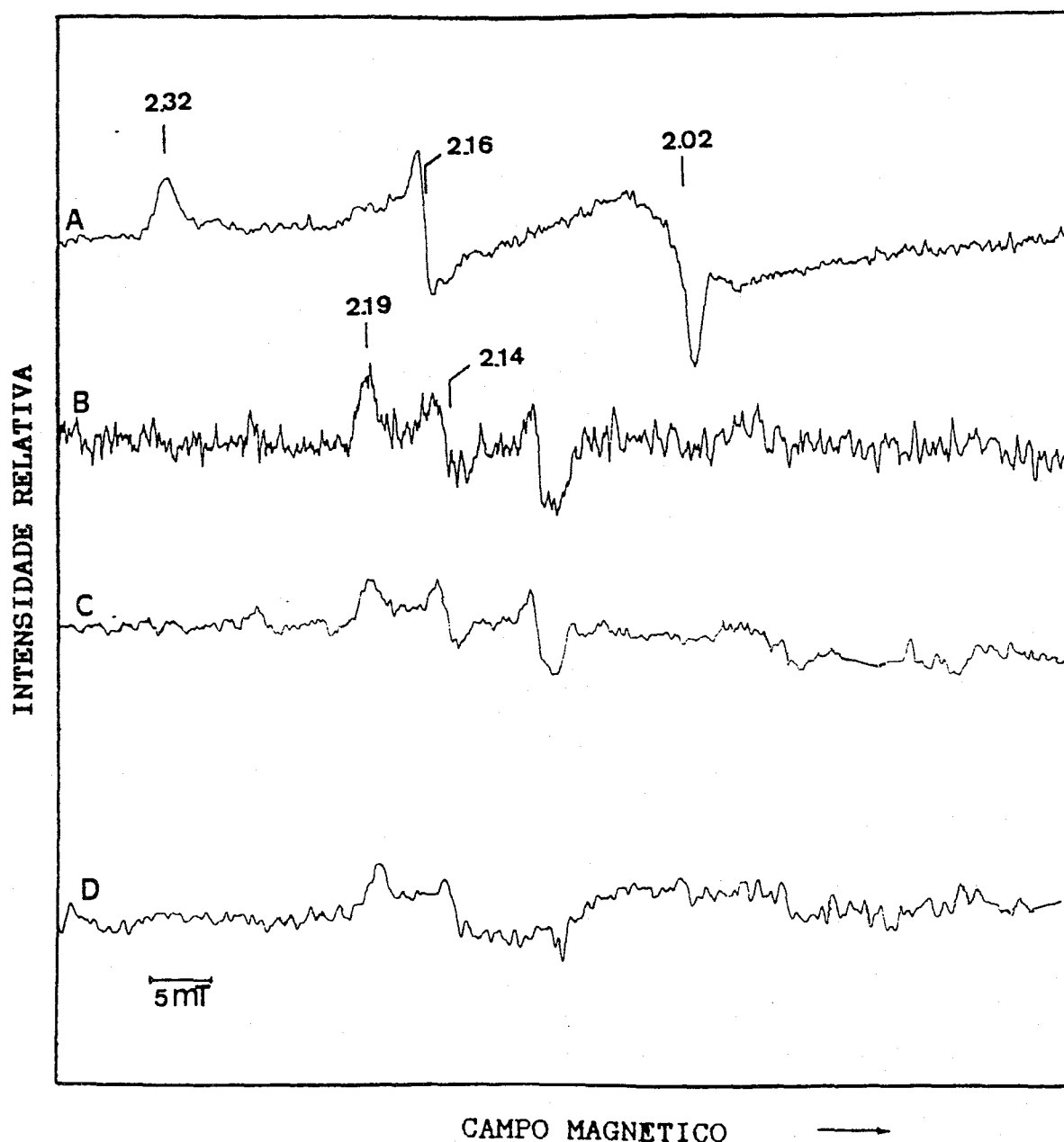


Figura IX.2: Espectros de RPE da hidrogenase de *D.desulfuricans* reduzida sob hidrogênio
A- Estado nativo; B-D- Hidrogenase reduzida ao fim de tempos crescentes sob hidrogênio
Ganho: A- $1,6 \times 10^5$; B- 2×10^5 ; C- 5×10^4 ; D- 4×10^5
Temperatura: 77 K; Amplitude de modulação: 1 mT
Potência de microondas: 2 mW; Frequência: 9,28 GHz

Verifica-se que após o desaparecimento do sinal rômboico presente no estado nativo se forma um novo sinal rômboico com valores de g a 2,19 , 2,14 e 2,02 , que atinge um máximo de intensidade em estados intermédios de redução, diminuindo de intensidade nas amostras mais reduzidas.

Este sinal de RPE tem características idênticas ao Sinal Ni-C observado na hidrogenase de *D.gigas* em estados intermédios de redução, pelo que deve resultar de uma espécie de níquel com $S=1/2$ (Ni(III) ou Ni(I)).

Não foram realizados estudos de RPE detalhados a baixa temperatura das amostras reduzidas sob hidrogénio. Em algumas amostras foi observado um sinal de RPE complexo a 4 K, com valores de g a 2,22 , 2,10 e componentes alargadas a campo alto, semelhante ao sinal a $g=2,21$ da hidrogenase reduzida de *D.gigas*, bem como um sinal isotrópico a $g=2,0$, do tipo observado em radicais. Krüger *et al* (1) referem que em algumas amostras reduzidas com hidrogénio se detectam sinais de RPE típicos de centros $[4Fe-4S]^{1+}$, com $g_m=1,94$, e um sinal com uma componente a $g=2,28$.

IX.4-Actividade catalítica

As hidrogenases de *D.desulfuricans* apresentam uma actividade específica de produção de hidrogénio relativamente fraca ($95-150 \mu\text{mol H}_2 \text{ produzido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) . H.Krüger (2) refere que nas condições padrão de ensaio desta actividade não se observa uma fase de activação. P.A.Lespinat *et al* (6) indicam, pelo contrário, que nas reacções de permuta D_2/H^+ catalisada por esta hidrogenase há de facto um fase de espera, mas durante a qual a

activação é bastante rápida.

Em colaboração com o grupo do Prof. J. LeGall (Cadarache) estudou-se a actividade de permuta D_2/H^+ de uma amostra de Hidrogenase II de *D. desulfuricans*. Verificou-se, embora qualitativamente, que a activação da enzima é bastante rápida, sendo acelerada por adição de ditionito de sódio. A razão de velocidades iniciais de formação dos produtos de permuta H_2 e HD, H_2/HD , entre pH=5 e pH=9, é inferior a 1 (cerca de 0,3). A actividade de permuta é fracamente dependente do pH naquela gama de valores, em contraste com a maioria das hidrogenases de bactérias redutoras de sulfato; o máximo de actividade situa-se entre pH 6 e pH 7.

X-5-Conclusão

A hidrogenase de *D. desulfuricans* (ATCC 27774) contém dois centros $[4Fe-4S]^{2+/1+}$, um centro $[3Fe-xS]$ e um centro de níquel, provavelmente no estado de oxidação Ni(III) na forma em que a enzima é isolada. Esta hidrogenase apresenta características de composição química e espectroscópicas bastante semelhantes à hidrogenase de *D. gigas*, quer no estado oxidado quer nos estados reduzidos.

Em relação à actividade catalítica, estas enzimas exibem propriedades diferentes no que se refere à sua activação : a hidrogenase de *D. gigas* apresenta sempre uma longa fase de activação, enquanto a hidrogenase de *D. desulfuricans* apresenta uma activação rápida. Esta diferença, como foi referido no capítulo V, pode estar relacionada com o estado enzimático em que estas hidrogenases são isoladas. De acordo com o modelo proposto para o

ciclo de activação da hidrogenase de *D.gigas*, a forma enzimática exibindo o sinale Ni-B ($g=2,33$, $2,16$ e $2,01$), corresponderá a uma forma desoxigenada, designada por "ready state", a partir do qual a activação é rápida (fase de redução). Os dados obtidos para a hidrogenase de *D.desulfuricans* sugerem que esta enzima é isolada na forma desoxigenada (apenas se detecta com intensidade apreciável o Sinale Ni-B), explicando-se assim a ausência da primeira fase de activação, longa, correspondendo à desoxigenação da enzima. Este facto sugere ligeiras diferenças estruturais entre as hidrogenases de *D.gigas* e *D.desulfuricans*, aliás de acordo com a diferença também observada na dependência com o pH da actividade de permuta D_2/H^+ destas hidrogenases.

IX.6-Referências

- 1) H.J.Krüger, B.H.Huynh, P.O.Ljungdahl, A.V.Xavier, D.V.Der Vartanian, I.Moura, H.D.Peck, Jr., M.Teixeira, J.J.G.Moura and J.Legall, (1982), J.Biol.Chem., 257, 14620-14623
- 2) H.J.Krüger, (1983), Master Thesis, Georgia University
- 3) M.C.Liu and H.D.Peck,Jr., (1981), J.Biol.Chem., 256, 13159-13164
- 4) D.J.Steenkamp and H.D.Peck,Jr., (1981), J.Biol.Chem., 256, 5450-5458
- 5) S.P.J.Albracht, J.W. van der Zwaan and R.D.Fontijn, (1984), Biochim.Biophys.Acta, 766, 245-256
- 6) P.A.Lespinat, Y.Berlier, G.Fauque, M.H.Czechowski, B.Dimon and J.LeGall, (1986), Biochimie, 68, 55-61

CAPITULO X:
ESTUDO COMPARATIVO
DE HIDROGENASES DE DESULFOVIBRIO

Neste capítulo serão comparadas detalhadamente as propriedades físico-químicas das hidrogenases de bactérias redutoras de sulfato do género *Desulfovibrio* caracterizadas neste trabalho e de outras hidrogenases do tipo [NiFe] destes organismos referidas na literatura. Dar-se-á particular ênfase à constituição dos centros activos e à sua relação com as propriedades catalíticas destas enzimas. Será discutida a possibilidade de haver um mecanismo comum de activação e de redução/oxidação da molécula de hidrogénio pelas hidrogenases destes organismos.

As hidrogenases isoladas de *Desulfovibrio* apresentam uma grande diversidade em relação à sua localização (têm sido isoladas hidrogenases periplásmicas, citoplásmicas e ligadas à membrana), estrutura de subunidades, propriedades catalíticas (produção de hidrogénio versus consumo de hidrogénio e na reacção de permuta D_2/H^+), passos de activação e sensibilidade a oxigénio, CO e a agentes desnaturantes. As características básicas destas hidrogenases são apresentadas na Tabela X.1.

As hidrogenases têm massas moleculares entre 50 e 100 kDa, contendo em geral duas subunidades (estrutura $\alpha\beta$). Uma das subunidades tem geralmente uma massa molecular de cerca de 50-60 kDa, o que parece ser comum à maioria das hidrogenases bacterianas (1,2). Não é ainda conhecida a distribuição dos centros activos pelas subunidades.

Em *D. baculatus* e *D. desulfuricans* (Norway 4) (3,4) foram isoladas pelo menos duas formas diferentes de hidrogenase: uma solúvel e outra ligada à membrana. Os dados disponíveis não permitem ainda uma distinção correcta destas duas hidrogenases e, tal como foi referido a propósito das hidrogenases de bactérias

TABELA X.1:

COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES FISICO-QUÍMICAS DE HIDROGENASES [NiFe] DE *DESULFOVIBRIO*

Propriedade	<i>D.salexigens</i> (British guiana NCIB 8403)	<i>D.gigas</i> (NCIB 9332)	<i>D.Multispirans</i> n.sp	<i>D.desulfuricans</i> (b) (Norway 4) membranar solúvel		<i>D.baculatus</i> (c) (estirpe 9974) periplásmica	<i>D.desulfuricans</i> (ATCC 27774) membranar	
localização	periplasma	periplasma	citoplasma	membrana	citoplasma	periplasma	membrana	n.r.
Massa Molecular (kDa)	98,0	89,5	82,5	87,0	85,0	100,0	110,0	77,6
subunidades	2	2	2	2	2	2	2	2
níquel ^(a)	1	1	1	+ (EPR)	1	1	1	1
selênio ^(a)	1	0	0	0	1	1	1	0
Ferro não ^(a) hémico	12-15	11	11	6	8	12	12	12
- [3Fe-xS]	n.d.	1	1	+		+	+	1
- [4Fe-4S] ^{2+/1+}	+ (prov. 2)	2	+ (prov. 2)	+ (RPE)	2	+ (prov.2)	+ (prov.2)	2
Actividade específica (μmoles H ₂ /min.mg)								
evolução	760	440	790	70	700	527		152
consumo	n.d.	200	586	200	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Referências	(5,6)	(7-11)	(12)	(3)	(4)	(13)	(13)	(14,15)

nr - não referido

(a) - valores em átomo-g de elemento por mole de enzima

(b) Detectada também uma fracção de hidrogenase periplásmica

(c) Detectada uma possível hidrogenase citoplásmica (Capítulo VI)

metanogénicas, é necessário um estudo genético e imunológico detalhado bem como uma clarificação da localização das hidrogenases destes organismos para verificar se de facto as hidrogenases isoladas são diferentes. Este aspecto é fundamental, como foi referido no capítulo I, para verificar a hipótese de reciclagem de hidrogénio no metabolismo das bactérias redutoras de sulfato do género *Desulfovibrio*.

De entre todas as hidrogenases caracterizadas de *Desulfovibriones* apenas a de *D.vulgaris* parece não conter níquel (16). Todas as outras hidrogenases destes organismos contêm um átomo-g de níquel e 6-12 átomo-g de ferro não hémico por mole de enzima. Os átomos de ferro encontram-se agrupados em centros Fe/S, possivelmente apenas do tipo $[3\text{Fe-xS}]$ e $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$. Nas hidrogenases de *D.baculatus*, *D.salexigens* e *D.desulfuricans* (Norway 4) (4) foi detectada a presença de selénio, em quantidades equimolares com o níquel.

Nas alíneas seguintes serão discutidas as propriedades espectroscópicas (RPE e Mössbauer) que levaram à caracterização dos grupos prostéticos destas enzimas.

X.1-Estado nativo de hidrogenases [NiFe]

Na tabela X.2 e nas figuras X.1-2 são indicadas as principais características dos espectros de RPE observados para hidrogenases [NiFe] de *Desulfovibriones*.

X.1.1-Centro de Níquel

As hidrogenases de *D.gigas*, *D.desulfuricans* (ATCC 27774) (15) *D.desulfuricans* (Norway 4, membranas) (3), *D.baculatus* (mem-

branar) e *D.multispirans* n.sp (12) apresentam no estado nativo sinais de RPE rômnicos, com valores de g a cerca de 2,3 , 2,23 e 2,0 , semelhantes aos sinais de RPE observados nas hidrogenases de *Mb.thermoautotrophicum* (17,18) e em membranas de *Mb.bryantii*(19). Estes sinais são detectados optimamente a temperaturas cerca de 77 K.

TABELA X.2: Sinais de RPE de Hidrogenases [NiFe] nativas de *Desulfovibriones*

Organismo (Ref.)	Sinais de RPE			centros [3Fe-xS] (Sinal a g=2,02)
	Niquel g ₁	Niquel g ₂	Niquel g ₃	
<i>D.gigas</i> (NCIB 9332)	2,31 2,33	2,23 2,16	2,02 2,02	+
<i>D.desulfuricans</i> (ATCC 27774)	2,32	2,16	2,01	+
<i>D.desulfuricans</i> (Norway 4, solúvel)(4)	2,22	2,07	2,016	+ (a)
<i>D.desulfuricans</i> (Norway 4, membranar)(3)	2,32	2,23	2,014	+ (a)
<i>D.salexigens</i> (NCIB 8403)	---- Silenciosa em RPE ----			
<i>D.multispirans</i> n.sp. (12)	2,31	2,22	2,00	+
<i>D.baculatus</i> (9974)				
- membranar	2,34 2,33	2,15 2,24	2,0 2,0	+(a)
- periplásmica	2,20	2,06	2,0	+ (a)
- citoplásmica	---- Silenciosa em RPE ----			

+ : presente; - : ausente ; (a) de fraca intensidade

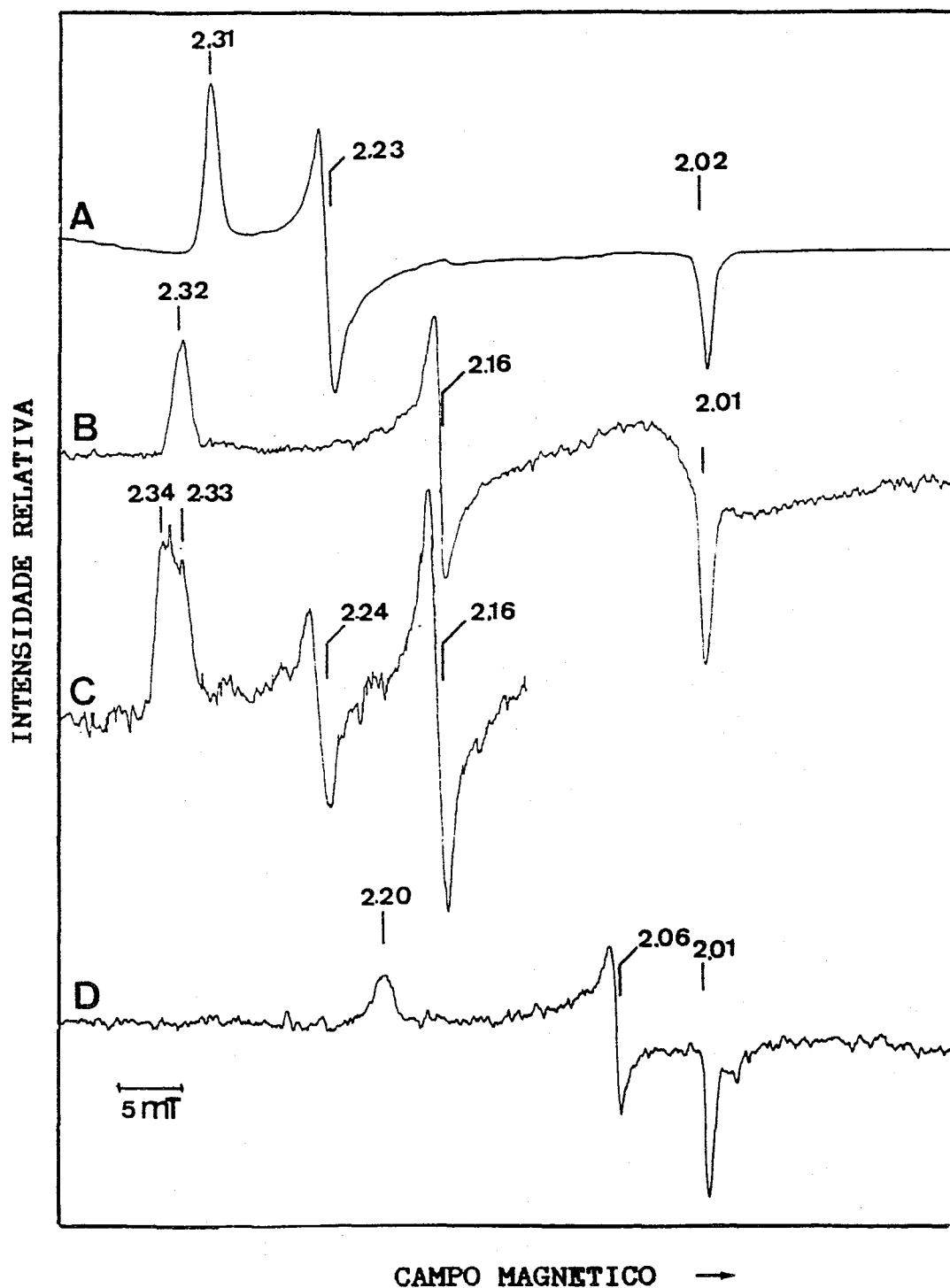


Figura X.1: Sinais de RPE de níquel de hidrogenases nativas [NiFe] de *Desulfovibrionaceae*
A-*D. gigas*; B-*D. desulfuricans* (ATCC 27774); C-*D. baculatus* (membranar); D-*D. baculatus* (citoplasmica)
Temperatura: 77 K (A,B) e 40 K (C,D). Frequência: 9,28 GHz (A,B) e 9,41 GHz (B,C). Modulação : 1 mT; Potência: 2 mW

Por substituição isotópica por ^{61}Ni ($I=3/2$) nas hidrogenases de *D.gigas* e *D.desulfuricans* (ATCC 27774), observou-se alargamento das linhas a $g=2,3$ e $2,23$ (*D.gigas*) e $2,16$ (*D.Desulfuricans*) e estrutura hiperfina resolvida a $g=2,0$ nos sinais de RPE destas enzimas (9,15), bem como nas hidrogenases daqueles organismos metanogénicos, o que provou inequivocamente que aqueles sinais de RPE são devidos a espécies paramagnéticas de níquel. Esta espécie tem sido identificada como um ião Ni(III) numa geometria octaédrica com distorção tetragonal, num campo de ligandos forte, resultando num sistema com $S=1/2$ e com o electrão desemparelhado numa orbital d_{z^2} . Diversos factos suportam esta hipótese: as características de relaxação e os valores de g destes sinais de RPE são semelhantes aos de complexos de Ni(III) com ligandos peptídicos; apenas os iões Ni(III) e Ni(I) , de entre os possíveis estados de oxidação do níquel, podem dar origem a sinais de RPE característicos de sistemas com $S=1/2$. Os potenciais de redução $\text{Ni(II)}/\text{Ni(I)}$ são em geral bastante negativos (cerca de -1 V) o que torna difícil explicar a estabilidade do estado de oxidação Ni(I) no estado oxidado das hidrogenases, em solução aquosa e na presença de oxigénio. Assim, é provável que o estado de oxidação do níquel no estado de nativo das hidrogenases seja de facto Ni(III) ; a ocorrência de transições redox associadas a estes sinais de RPE, possivelmente envolvendo reacções de redução do níquel, leva também a preferir a hipótese de o estado de oxidação deste ião no estado nativo destas enzimas ser o estado Ni(III) .

As hidrogenases de *D.gigas*, *D.baculatus* (membranar) e *D.desulfuricans* (Norway 4, membranar) (3) apresentam dois sinais

de RPE rômnicos distintos, com valores de g a 2,33 , 2,16 e 2,0 (Sinal Ni-B) e a 2,31 , 2,23 e 2,0 (Sinal Ni-A). O Sinal Ni-B é semelhante ao sinal de RPE observado na hidrogenase de *D.desulfuricans* (ATCC 27774) (15) e, para a hidrogenase de *D.gigas* (Capitulo V) verificou-se que a intensidade relativa dos sinais Ni-A e Ni-B pode ser alterada por reoxidação anaeróbica de amostras de hidrogenase reduzidas sob hidrogênio: neste processo, o primeiro sinal de RPE a formar-se é o Sinal Ni-B, seguido pelo aparecimento do Sinal Ni-A, continuando-se a reoxidação. Conforme referido no capítulo V, o Sinal Ni-A pode estar associado a uma forma oxigenada da hidrogenase, enquanto o sinal Ni-B poderá corresponder a uma forma desoxigenada da enzima (ver alínea X.5).

A intensidade dos sinais de RPE das hidrogenases de *D.baculatus* (membranar) e *D.desulfuricans* (Norway 4, membranar) (3) é muito fraca (inferior a 0,1% do níquel detectado quimicamente), indicando que a maioria dos centros de níquel se encontra numa forma silenciosa em RPE. Para as hidrogenases de *D.gigas*, *D.desulfuricans* (ATCC 27774) (15) e *D.multispirans* (12) a intensidade destes sinais de níquel tem variado entre 1 e cerca de 0,2 spin/mole de enzima, conforme a preparação de hidrogenase.

As hidrogenases de *D.desulfuricans* (Norway 4, solúvel) (4) e de *D.baculatus* (periplásmica), dão origem a sinais de RPE rômnicos (também de fraca intensidade) com valores de g a 2,20 , 2,06 e 2,0. Tendo em conta que estas enzimas contêm apenas ferro não hémico e níquel, estes sinais podem, pelas razões atrás apontadas, ser também atribuídos a uma espécie paramagnética de níquel no estado de oxidação Ni(III), mas com uma coordenação ou geometria diferente das correspondentes aos centros de níquel com

os sinais de RPE Ni-A e Ni-B.

As hidrogenases de *D.salexigens* e *D.baculatus* (citoplásmica) não revelam sinais de RPE rômnicos observáveis a alta temperatura, sendo praticamente silenciosas em RPE no estado nativo (ver secção seguinte).

X.1.2-Centros Fe/S

A temperaturas inferiores a 30 K, os espectros de RPE das hidrogenases de *D.gigas*, *D.desulfuricans* (ATCC 27774) e *D.multispirans* (12) são dominados por um sinal intenso e praticamente isotrópico a $g=2,02$ (Figura X.2).

Estudos detalhados de espectroscopia de Mössbauer das hidrogenases nativas de *D.gigas* e *D.desulfuricans* (ATCC 27774) (15) permitiram atribuir estes sinais a centros $[3Fe-xS]$ no estado oxidado ($S=1/2$). Os valores de desvio isomérico ($\delta = 0,36$ mm/s) para os espectros de Mössbauer dos centros $[3Fe-xS]$ destas hidrogenases são maiores que os dos centros $[3Fe-xS]$ em outras proteínas ($\delta = 0,30$ mm/s para a Fd II de *D.gigas* (20), aconitase (21) e Fd I de *A.vinelandii* (22)) sugerindo que os iões ferro dos centros $[3Fe-xS]$ das hidrogenases poderão estar, em parte, coordenados a ligandos oxigenados ou nitrogenados.

Em outras hidrogenases $[NiFe]$ de *Desulfovibriones* têm sido detectados sinais de RPE deste tipo, mas com uma intensidade bastante inferior: hidrogenases de *D.desulfuricans* (Norway 4, membranas (3) e solúvel (4)), e *D.baculatus* (membranas e periplásmica, inferior a 0,01 spin/mol). As hidrogenases de *D.salexigens* e *D.baculatus* (citoplásmica) apresentam sinais de intensidade ainda mais fraca (inferior a 0,001 spin/mol).

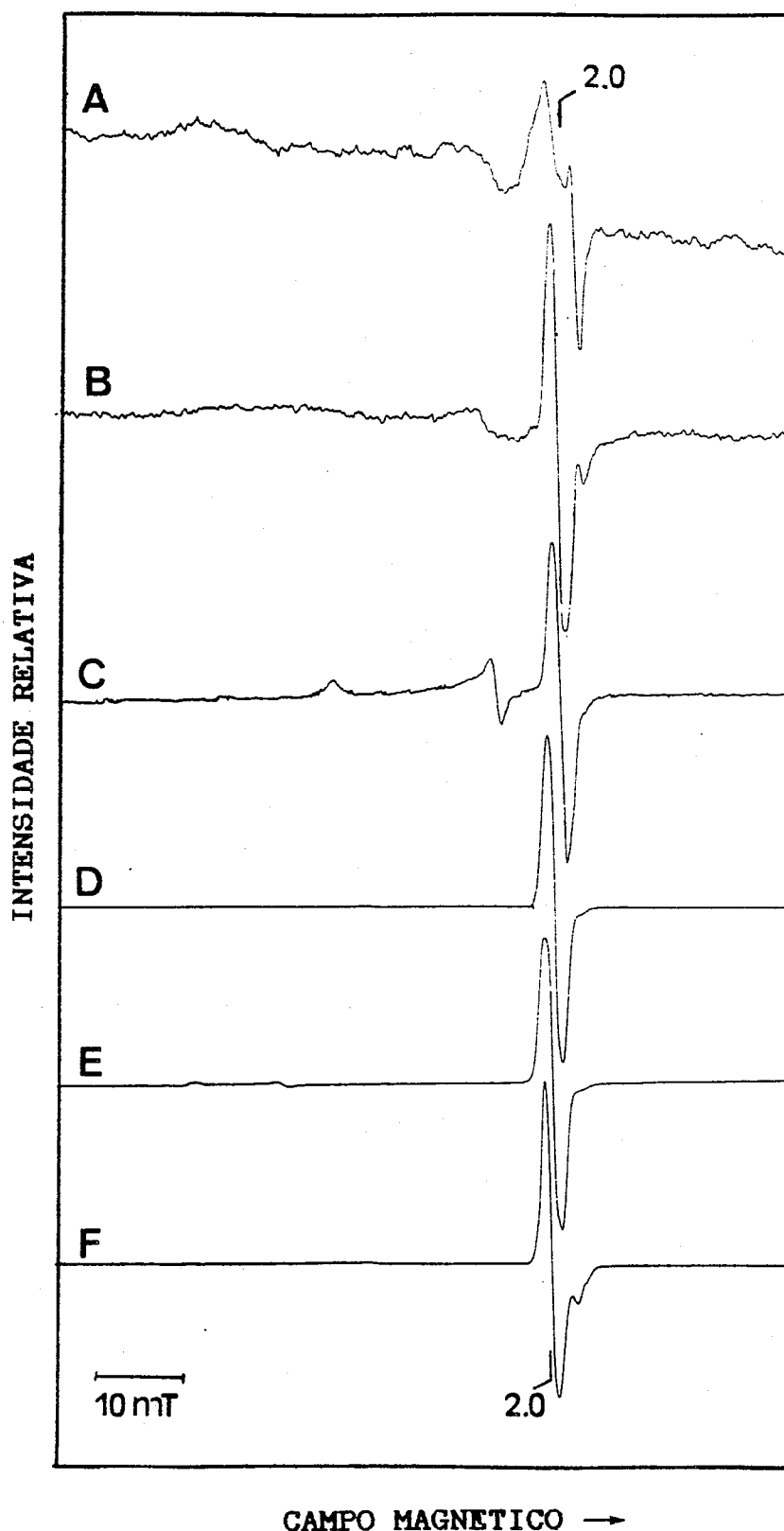


Figura X.2: Espectros de RPE a baixa temperatura de hidrogenases [NiFe] nativas de *Desulfovibrionas*
 A-*D. salaxigens*; B-*D. baculatus* (citoplasmica);
 C-*D. baculatus* (membranar); D-*D. baculatus* (periplasmica)
 E-*D. gigas*; F-*D. desulfuricans* (ATCC 27774) Temperatura:
 8 K; Frequência: 9,41 GHz; Modulação: 1 mT

É necessário o estudo através de outras técnicas espectroscópicas, nomeadamente de Mössbauer, para verificar se estas hidrogenases contêm centros $[3\text{Fe-xS}]$ em quantidade significativa no estado nativo, e qual o seu estado de oxidação ou de spin, ou se estes sinais de RPE resultam apenas de uma degradação parcial de centros $[4\text{Fe-4S}]$ por oxidação. Para a hidrogenase de *D. desulfuricans* (Norway 4, solúvel) (23), estudos de espectroscopia de Mössbauer e de MCD não permitiram a detecção de agregados $[3\text{Fe-xS}]$ no estado nativo desta hidrogenase, embora por espectroscopia de Raman seja observada a sua presença, de acordo com o sinal de RPE a $g=2,01$, de fraca intensidade, desta enzima.

Os estudos de Mössbauer das hidrogenases de *D. gigas*, *D. desulfuricans* (ATCC 27774) e *D. desulfuricans* (Norway 4, membranas e solúvel) (23), mostraram que estas enzimas no estado nativo contêm dois centros $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ no estado de oxidação +2.

Como conclusão, pode dizer-se que as hidrogenases $[\text{NiFe}]$ isoladas de organismos redutores de sulfato do género *Desulfovibrio* apresentam uma certa diversidade em relação ao estado de oxidação ou de coordenação do centro de níquel; todas estas enzimas parecem conter pelo menos dois centros $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$, provavelmente no estado de oxidação 2^+ (ver secção seguinte). A presença inequívoca de centros $[3\text{Fe-xS}]$ apenas foi demonstrada para as hidrogenases de *D. gigas* e *D. desulfuricans* (ATCC 27774) (10,15,24). Estes dados serão correlacionados com as propriedades de activação das hidrogenases nas reacções de produção ou consumo de hidrogénio e de permuta D_2/H^+ nas alíneas X.4 e X.5.

X.2-Estados intermediários de redução de hidrogenases [NiFe]

Na figura V.12 mostrou-se uma sequência típica de espectros de RPE a 77 K obtidos por redução da hidrogenase de *D.gigas* sob hidrogênio (Capítulo V), e que se pode considerar como representando o protótipo das modificações dos sinais de RPE de hidrogenases [NiFe] nestas condições.

Após o desaparecimento do sinal a $g=2,02$ devido ao centro [3Fe-xS] e dos sinais Ni-A e Ni-B obtém-se um estado silencioso em RPE (a alta e baixas temperaturas); segue-se a formação de um novo sinal rômboico, com valores de g a 2,19, 2,14 e 2,01 (Sinal Ni-C), que passa por um máximo de intensidade em estados intermediários de redução. Finalmente, obtém-se um novo estado silencioso em RPE a alta temperatura, nos estados de redução obtidos ao fim de tempos mais longos de incubação sob hidrogênio. O sinal rômboico foi também inequivocamente atribuído a uma espécie de níquel, nos estados de oxidação Ni(III) ou Ni(I), devido à observação de alargamento das linhas a $g=2,19$ e 2,14 e de estrutura hiperfina resolvida na linha a $g=2,01$ nas amostras de hidrogenase enriquecida em ^{61}Ni (9).

Para as hidrogenases de *D.baculatus*, *D.salexigens*, *D.desulfuricans* (ATCC 27774) e *D.multispirans* n.sp (12) foram detectados sinais de RPE com valores de g semelhantes aos do sinal Ni-C (Figura X.3 e Tabela X.3), para os quais os estudos preliminares realizados neste trabalho indicam um comportamento redox idêntico ao daquele sinal da hidrogenase de *D.gigas*.

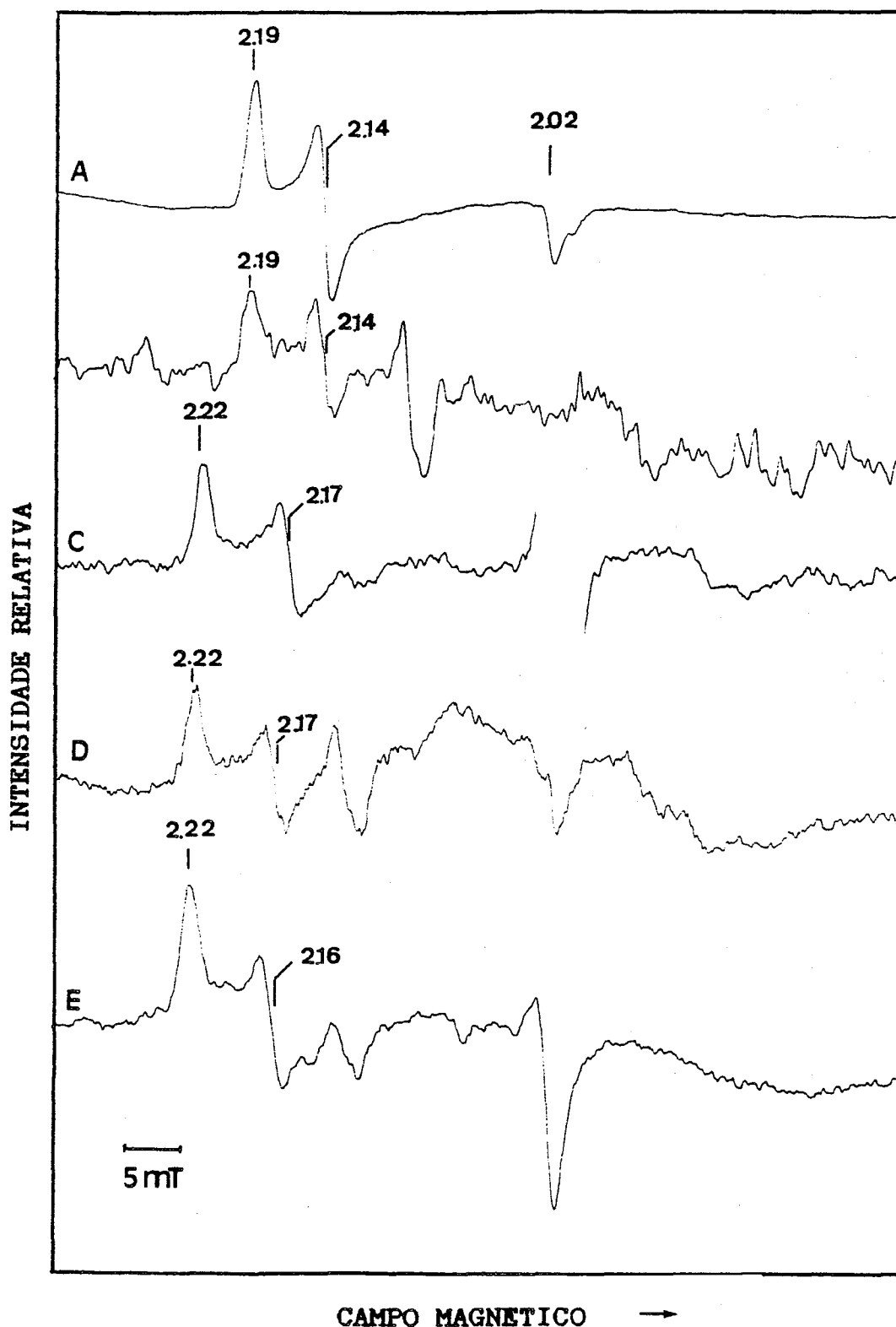


Figura X.3: Espectros de RPE de hidrogenases [NiFe] de *Desulfovibrionaceae* no estado reduzido - Sinal Ni-C
A- *D. gigas*; B- *D. desulfuricans* (ATCC 27774)
C- *D. salexigens*; D- *D. baculatus* (periplasmica)
E- *D. baculatus* (citoplasmica)
Temperatura : 77 K (A,B), 25 K (C), 37 K (D) e 27 K (E)
Potência 2 mW; Modulação : 1 mT;
Frequência: 9,28 GHz (A,B) e 9,41 GHz (C-D)

TABELA X.3: Sinais de RPE de Hidrogenases [NiFe] de *Desulfovibriones*, reduzidas sob H_2

Organismo (ref.)	Sinais de RPE			centros $[4Fe-4S]^{1+}$
	Niquel g ₁	Niquel g ₂	Niquel g ₃	
<i>D.gigas</i> (NCIB 9332)	2,19	2,14	2,02	+ (2)
<i>D.desulfuricans</i> (ATCC 27774) (15)	2,19	2,14	2,02	+
<i>D.desulfuricans</i> (Norway 4, solúvel) (4)	2,34 2,20	2,12 2,15	2,12 --	+
<i>D.desulfuricans</i> (Norway 4, membranar)(3)	2,19	2,15	--	
<i>D.salexigens</i> (NCIB 8403)	2,22	2,16	2,0	+ (2)
<i>D.multispirans</i> n.sp. (12)	2,19	2,14	2,01	n.r.
<i>D.baculatus</i> (9974) (a)				
- membranar	2,20	2,16	2,0	+ (2)
- periplâmica	2,20	2,16	2,0	+ (2)
- citoplâmica	2,20	2,16	2,0	+ (2)

(a) Para as hidrogenases deste organismo são ainda detectados outros sinais de RPE no estado reduzido, possivelmente devidos a níquel (ver texto). +: presente; -: ausente

Estudos de RPE a baixa temperatura de estados de redução destas hidrogenases em que o sinal Ni-C está presente revelam sinais de RPE complexos que podem ser decompostos essencialmente em dois grupos (Figura X.4):

- Sinais com $g_m \sim 1,94$, típicos de centros $[4Fe-4S]^{1+}$, e que estudos de dependência com a temperatura e com a potência de microondas, para as hidrogenases de *D.gigas*, *D.Baculatus* e *D.salexigens*, permitiram resolver em dois conjuntos distintos de valores de g , atribuídos a dois centros $[4Fe-4S]^{1+}$.

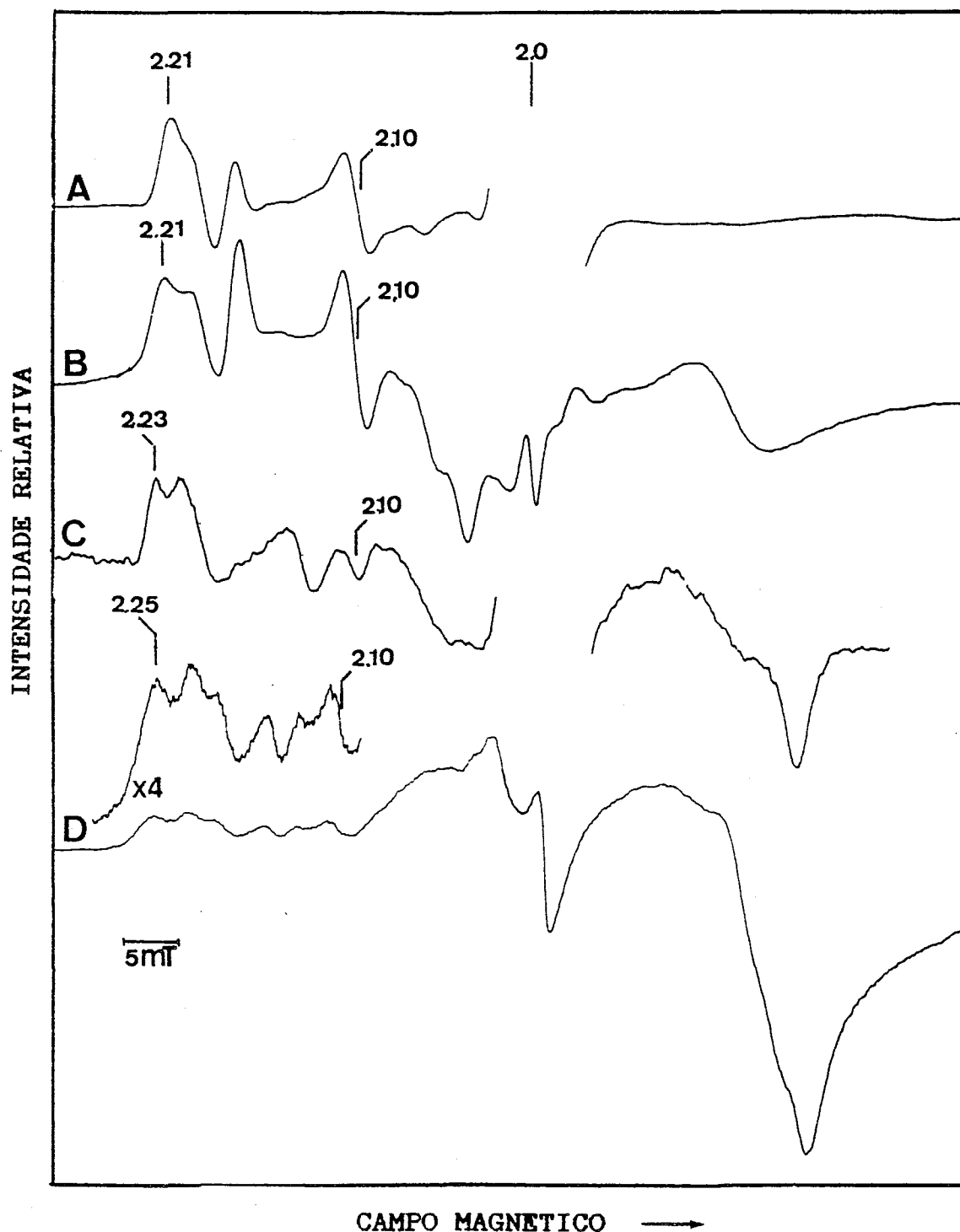


Figura X.4: Espectros de RPE a baixa temperatura de
 Hidrogenases [NiFe] de *Desulfovibrio* reduzidas Sinal "g=2,21"
 A- *D. gigas*; B- *D. desulfuricans* (ATCC 27774)
 C- *D. salexigens*; D- *D. baculatus* (citoplasmica)
 Temperatura: 4,2 K e 7 K (D); Potência de microondas: 2 mW
 Modulação de amplitude: 1 mT; Frequência: 9,41 GHz

- Sinais com valores de g superiores a 2, complexos, com características de relaxação electrónica rápida, sendo observados apenas a temperaturas baixas e com potências de radiação de microondas elevadas. Este sinal tem sido designado por sinal a " $g=2,21$ " (valor de g máximo para este sinal na hidrogenase de *D.gigas*).

É de referir ainda que em algumas preparações das hidrogenases de *D.gigas* e *D.desulfuricans* (ATCC 27774) nos estados reduzidos se observam apenas os sinais a $g=2,21$, não se detectando sinais de centros $[4Fe-4S]$ reduzidos.

Os resultados de titulações redox seguidas por RPE para as hidrogenases de *D.gigas* e *D.salexigens* mostraram que as intensidades relativas dos sinais de RPE a $g=2,21$ e Sinal Ni-C variam com o potencial redox, indicando que estes sinais de RPE têm origem em espécies diferentes (ver alínea seguinte).

Os sinais de RPE rômnicos observados nos estados intermédios de redução para estas diferentes hidrogenases têm propriedades de relaxação, valores de g e comportamento redox semelhantes pelo que, em comparação com o sinal Ni-C da hidrogenase de *D.gigas*, podem ser atribuídos a uma espécie paramagnética de níquel com características próximas às da espécie associada ao sinal Ni-C desta hidrogenase.

Estes dados permitem ainda verificar que, apesar das diferenças detectadas no estado nativo destas enzimas, no estado reduzido os espectros de RPE são praticamente idênticos, o que sugere um possível mecanismo catalítico comum às hidrogenases $[NiFe]$ de *Desulfovibriones* (ver secção X.5)

Apenas para a hidrogenase de *D.gigas* foram realizados estudos de espectroscopia de Mössbauer detalhados nos estados

reduzidos (Capítulo V, (24)). Estes estudos indicaram que nestes estados o centro $[3\text{Fe-xS}]$ se encontra no estado reduzido, paramagnético ($S > 1$ e inteiro), não ocorrendo a sua interconversão em centros $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$, e que nos estados de maior redução a enzima contém dois centros $[4\text{Fe-4S}]$ no estado de oxidação +1. Os estudos de Mössbauer realizados para a hidrogenase de *D. desulfuricans* (Norway 4, solúvel) (17) no estado reduzido revelaram que esta enzima no estado mais reduzido obtido pelos autores apresenta metade dos centros $[4\text{Fe-4S}]$ reduzidos, no estado de oxidação 2^+ .

X.3-Determinação de potenciais redox

Foram realizadas titulações de oxidação/ redução, seguidas por RPE, sob hidrogénio ou por adição de ditionito de sódio, para as hidrogenases de *D. gigas*, *D. salaxigens* e *D. baculatus* (citoplásmica). Os resultados obtidos apresentam-se na figura X.5 podendo resumir-se essencialmente nos seguintes pontos:

- O sinal de RPE isotrópico do centro $[3\text{Fe-xS}]$ da hidrogenase de *D. gigas* desaparece num processo monoelectrónico com $E'_0 = -80$ mV. Os dados de espectroscopia de Mössbauer mostraram que este processo corresponde à redução do centro $[3\text{Fe-xS}]$ (10). Cammack et al (25) verificaram que este potencial é independente do pH.
- O Sinal Ni-A da hidrogenase de *D. gigas* desaparece também através de um processo redox monoelectrónico com $E'_0 = -220$ mV (pH=8,5) (10). Cammack et al mostraram que este potencial é dependente do pH (decrêscimo de -60 mV po unidade de pH) (25). Os dados de espectroscopia de Mössbauer podem ser explicados atribuindo este processo à redução de um centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$.

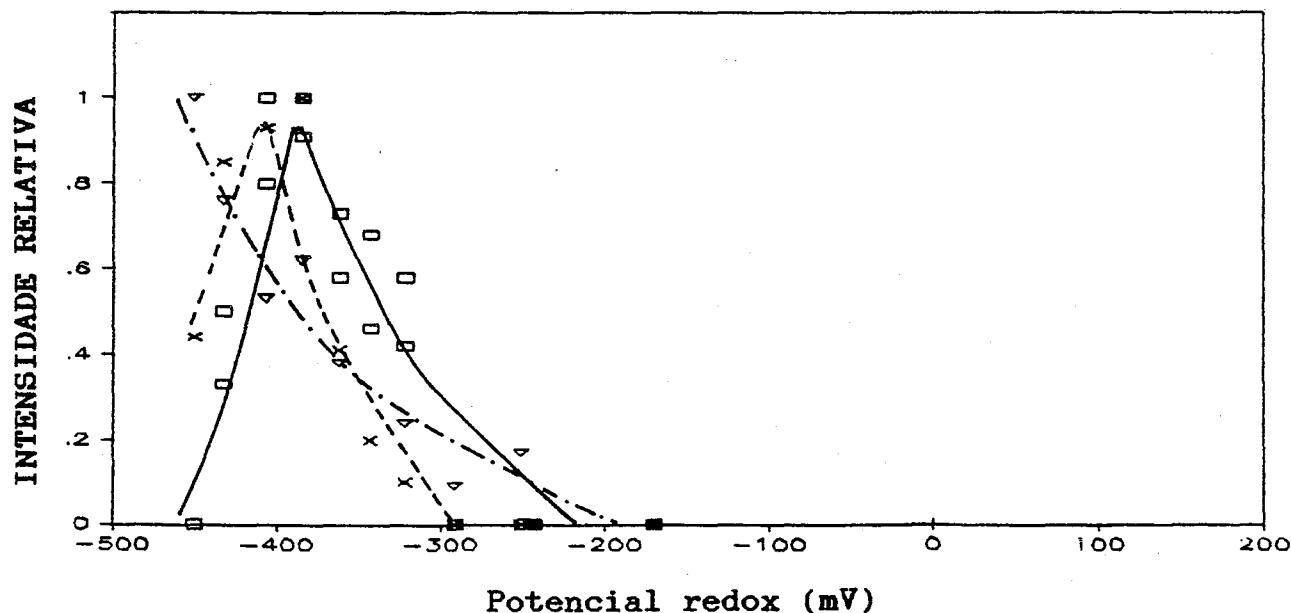
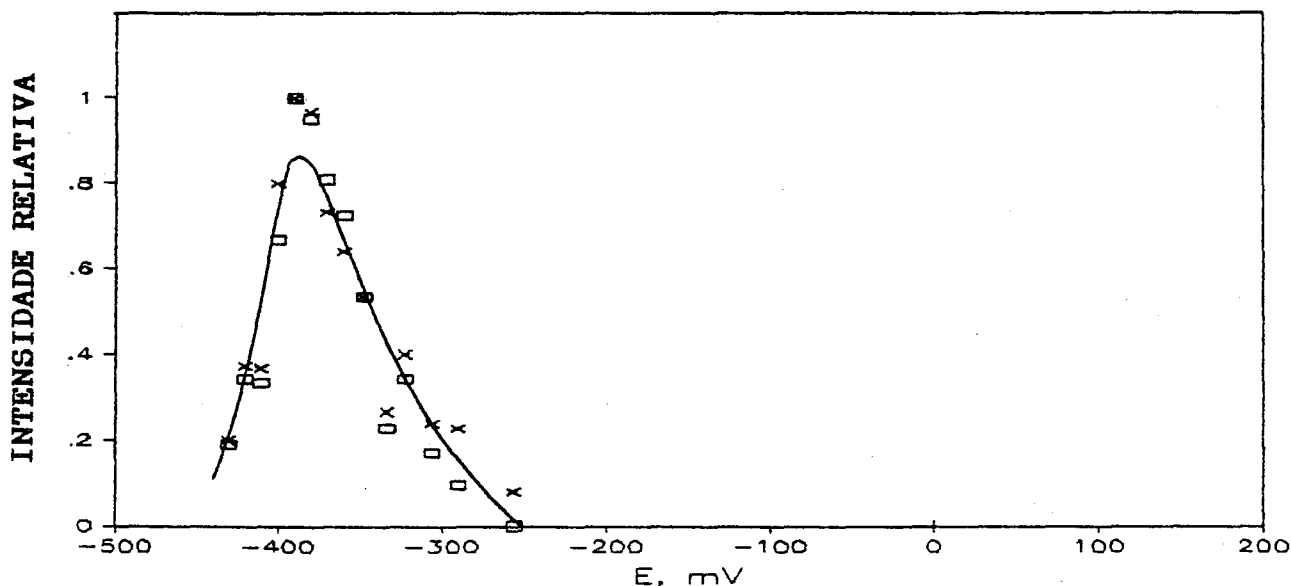
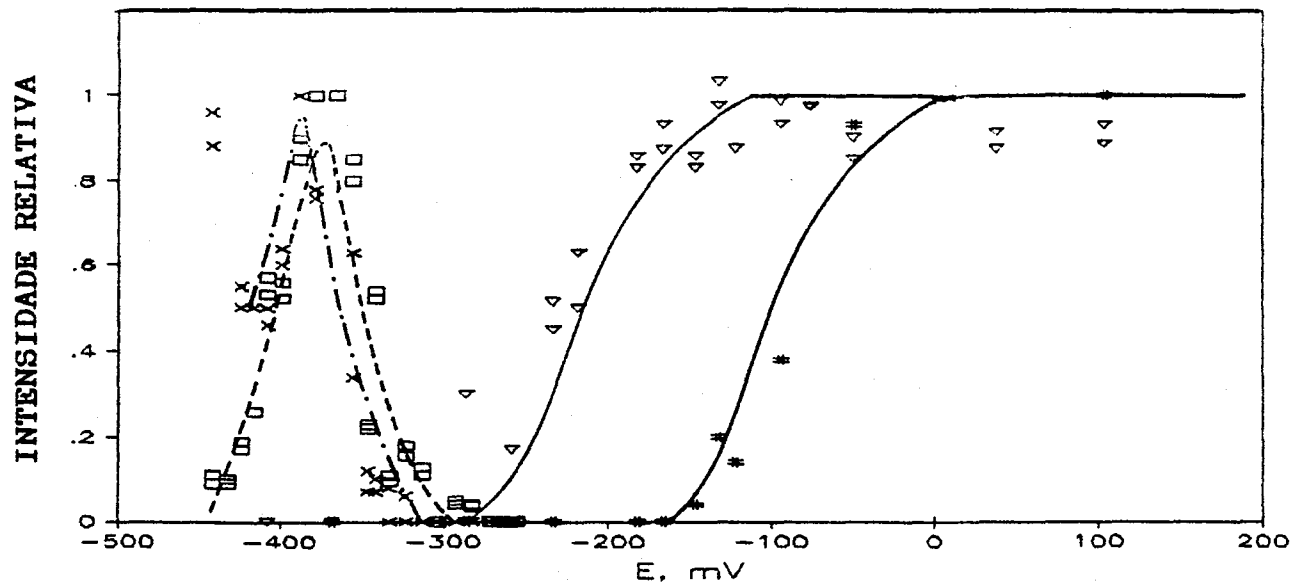


Figura X.5: Curvas de titulação redox seguidas por RPE para as hidrogenases de *D. gigas* (A), *D. baculatus* e *D. salenigens* (C) Representação da intensidade relativa do sinal em função do potencial redox. A- # Sinal a $g=2,02$ (Centro $[3Fe-xS]$) ; v Sinal Ni-A; □ Sinal Ni-C; x Sinal a " $g=2,21$ ". B- Sinal Ni-C ($g=2,22$); C- □ Sinal Ni-C; x Sinal a " $g=2,21$ "; v Sinais a $g_m=1,94$

O valor de potencial é semelhante ao obtido para o signal Ni-A da hidrogenase de *Ch.vinosum* (16); pelo contrário, um sinal de RPE de níquel, semelhante ao signal Ni-A, na hidrogenase de *Nb.formicicum* (27) desaparece apenas a potenciais inferiores a -400 mV.

- Os sinais Ni-C destas hidrogenases apresentam curvas de titulação idênticas, em forma de sino (Figura X.6). O seu aparecimento ocorre a potenciais inferiores a cerca de -300 mV, atingem um máximo de intensidade perto de -380 mV e a potenciais inferiores a -450 mV são já dificilmente detectáveis.

- Os sinais a $g=2,21$ das hidrogenases de *D.gigas* e *D.salexigens* surgem a potenciais um pouco mais negativos que os sinais Ni-C (<-320 mV), atingem um máximo de intensidade a cerca de -400 mV e diminuem de intensidade a valores mais negativos de potencial, embora sejam ainda detectáveis a -450 mV.

X.4-Actividade catalitica

A actividade catalitica das hidrogenases de *Desulfovibriones* só foi estudada em detalhe para a hidrogenase de *D.gigas*, verificando-se que esta hidrogenase é isolada num estado não activo (9,28-30). A actividade catalitica máxima desta enzima só é obtida ao fim de uma fase de espera, que consiste em dois processos: um, mais longo, associado à desoxigenação da enzima, seguido de outro passo mais rápido, associado a um processo de redução da hidrogenase (28,29). Os estudos de Lissolo et al (29) revelaram que a activação desta hidrogenase sob hidrogénio está associada a um processo redox com $E'_O = -350$ mV (pH=8), dependente do pH (-60 mV por unidade de pH). A sua desactivação, segundo Merge et al (30), está ligada a um processo redox com $E'_O = -220$ mV,

também dependente do pH. Como referido no capítulo V, estes potenciais redox são semelhantes aos detectados para a formação do Sinal Ni-C e para o desaparecimento do sinal Ni-A, respectivamente.

Estudos preliminares da hidrogenase de *D.desulfuricans* (ATCC 27774) revelaram que a activação desta enzima é bastante mais rápida que a da hidrogenase de *D.gigas*, estando possivelmente associada apenas ao processo de redução. Se assim for de facto, esta observação sugere, como foi proposto no capítulo V, que o Sinal Ni-A (valores de g a 2,31, 2,23 e 2,02) está associado a uma forma inactiva da enzima (forma oxigenada), enquanto o sinal Ni-B (valores de g a 2,33, 2,16 e 2,02) está associado a uma forma desoxigenada, designada por "ready state", no sentido em que a partir desta forma enzimática a activação da hidrogenase é rápida. A hidrogenase membranar de *D.desulfuricans* (Norway 4), que no estado nativo apresenta sinais de RPE idênticos aos Sinais Ni-A e NiB da hidrogenase de *D.gigas* revela um comportamento na activação semelhante ao daquela hidrogenase (31); por reoxidação anaeróbica, os sinais Ni-A e Ni-B destas hidrogenases têm um comportamento análogo. Por outro lado, verifica-se que as hidrogenases de *D.salexigens*, *D.baculatus* e *D.desulfuricans* (Norway 4, solúvel) (4), quase silenciosas em RPE no estado nativo, não revelam fase de activação, isto é, a actividade máxima é atingida práticamente desde o início do ensaio. Por exemplo, para a hidrogenase solúvel de *D.desulfuricans* é necessário realizar os estudos de activação a temperaturas cerca de 0 °C para que a activação seja mensurável (31). Este dado sugere uma correlação entre as características espectroscópicas do estado nativo e as pro-

priedades das hidrogenases em relação á sua activação:

- as enzimas que no estado nativo apresentam sinais de RPE de níquel intensos têm de passar por uma fase de activação relativamente longa para que se revele a actividade catalítica máxima;
- as enzimas silenciosas em RPE no estado nativo encontram-se num estado cataliticamente activo.

Estas observações sugerem ainda que o estado activo destas hidrogenases, como foi proposto no capítulo V, corresponda a um estado silencioso em RPE (ver alínea X.5).

Na reacção de permuta D_2/H^+ detectam-se também algumas diferenças entre as hidrogenases de *Desulfovibriones*. As hidrogenases de *D.gigas*, *D.multispirans* e *D.desulfuricans* (ATCC 27774) apresentam, a pH=7,6, razões H_2/HD inferiores a 1 (cerca de 0,3). Pelo contrário, as hidrogenases de *D.baculatus* e *D.salexigens* apresentam nas mesmas condições razões superiores a 1. Verificou-se ainda que o valor desta razão é, para as hidrogenases de *D.baculatus* e *D.gigas*, dependente do pH, mas novamente se detecta um comportamento diferente: enquanto para a hidrogenase de *D.gigas* a razão é sempre inferior a 1 entre pH 5 e 11 (32), para as hidrogenases de *D.baculatus* esta razão é superior a 1 apenas a valores de pH superiores a ~6. Estes resultados sugerem diferenças estruturais entre os centros de activação da molécula de hidrogénio destas hidrogenases. De acordo com o mecanismo de cisão heterolítica da molécula de H_2 por estas enzimas, a activação do hidrogénio deve resultar na formação de um ião hidreto e de um protão, estabilizado por uma base, tal como foi evidenciado pelos sistemas modelo discutidos no capítulo II, em particular o complexo Pd(salen). De acordo com estes modelos, a actividade

destas hidrogenases deve depender das características ácido-base dos centros de ligação do protão e do hidreto. Em particular, supondo que o hidreto se liga sempre ao centro de níquel, a razão de produtos de permuta com o solvente dependerá do carácter ácido base do sítio aceitador do protão. Neste aspecto é particularmente relevante verificar que as hidrogenases que nas condições padrão apresentam razões superiores a 1 são as que contêm selênio em quantidades equimolares com o níquel, o que sugere um possível envolvimento deste elemento como aceitador do protão.

X.5-Mecanismo Catalítico de hidrogenases [NiFe]

Os dados disponíveis de espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica para as hidrogenases [NiFe] isoladas de *Desulfovibriones* resumem-se de forma esquemática na Tabela X.4. Nota-se que, como foi mencionado nas alíneas anteriores, existe uma certa diversidade em relação às características espectroscópicas do estado nativo; pelo contrário, é marcante a quase identidade dos sinais de RPE detectados nas amostras de hidrogenases nos estados de redução sob hidrogénio. Este facto sugere uma possível divisão das hidrogenases [NiFe] de *Desulfovibriones* em dois grupos:

-Grupo A , constituído pelas hidrogenases de *D.gigas*, *D.multispirans* n.sp., *D.desulfuricans* (ATCC 27774) e *D.desulfuricans* (Norway 4, membranas). Estas enzimas são activas em RPE no estado nativo, apresentando sinais de RPE rômnicos com valores de g a cerca de 2,3 2,2 e 2,0 (Sinais Ni-A e Ni-A), atribuídos a uma espécie paramagnética de Ni(III), e sinais praticamente isotrópicos centrados a $g=2,02$, atribuídos a centros [3Fe-xS] oxidados.

TABELA X.4: SINAIS DE RPE DETECTADOS EM HIDROGENASES DE *DESULFOVIBRIO*

	FORMA OXIDADA			FORMA REDUZIDA			
	Fe/S (g=2,02)	Sinal <u>Ni-A</u>	Sinal <u>Ni-B</u>	Sinal <u>Ni-C</u>	Sinal g=2,21	Fe/S (g=1,94)	Ref.

Hidrogenases tipo A: Requerem uma fase de activação lenta

<i>D.gigas</i> (NCIB 9332)	+	+	+	+	+	+	(8,9) ^b
<i>D.desulfuricans</i> (Norway 4) Membranar	+(c)	+	+	+	n.r.	+	(13)
<i>D.multispirans</i> n.sp.	+	+	+	+	+	+	(12)
<i>D.desulfuricans</i> (ATCC 27774)	+	-	+	+	+	+	(15)

Hidrogenases tipo B: Requerem uma fase de activação rápida

<i>D.desulfuricans</i> (Norway 4) Solúvel	+(c)	-	+(a)	n.r.	n.r.	+	(4,23)
<i>D.baculatus</i> (ATCC 9974)							
Citoplásmica	-	-	-	+	+	+	(b)
Periplásmica	+(c)	-	+(a)	+	+	+	(b)
Membranar	+(c)	+	+	+	+	+	(b)
<i>D.salexigens</i> (NCIB 8403)	-	-	-	+	+	+	(6, ^b)

(a) Valores de g diferentes dos determinados para o Sinal Ni-A da hidrogenase de *D.gigas*. (b) Este trabalho. (c) Fraca intensidade.
n.r. não referido na literatura ; + : presente; - : ausente

No estado em que são isoladas, estas enzimas são cataliticamente inactivas nas reacções de permuta D_2/H^+ , necessitando de processos de activação para revelarem a actividade catalitica máxima nestas reacções. Esta activação, de acordo com os resultados obtidos para a hidrogenase de *D.gigas*, corresponde a uma desoxigenação da enzima, seguida por uma fase mais rápida de redução de centros enzimáticos. O Sinal Ni-A destas hidrogenases parece estar associado á forma oxigenada, enquanto o sinal Ni-B está provavelmente associado á forma desoxigenada. Esta hipótese é corroborada pelo facto de a hidrogenase de *D.desulfuricans* (ATCC 27774), que no estado oxidado apresenta apenas um sinal rômboico do tipo Ni-B, para além do sinal isotrópico a $g=2,02$, necessitar sómente de uma fase de activação rápida. A fase de activação redutiva leva ao aparecimento de estados silenciosos em RPE. Na hidrogenase de *D.gigas* este estado silencioso parece conter o centro $[3Fe-xS]$ e um centro $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ reduzidos (9,24). O estado de oxidação neste estado de redução permanece incerto, embora alguns dados pareçam favorecer a hipótese de o ião de níquel manter o estado de oxidação Ni(III), estando acoplado magneticamente ao centro $[4Fe-4S]^{1+}$ (ver discussão no capítulo V). No entanto, não é ainda possível excluir a hipótese de o ião níquel neste estado enzimático se encontrar na forma de Ni(II). O estado silencioso em RPE destas hidrogenases poderá corresponder ao estado nativo das hidrogenases de Grupo B. E de referir também a semelhança dos sinais de RPE Ni-C das hidrogenases deste grupo: todos estes sinais têm valores de g a 2,19, 2,14 e 2,02.

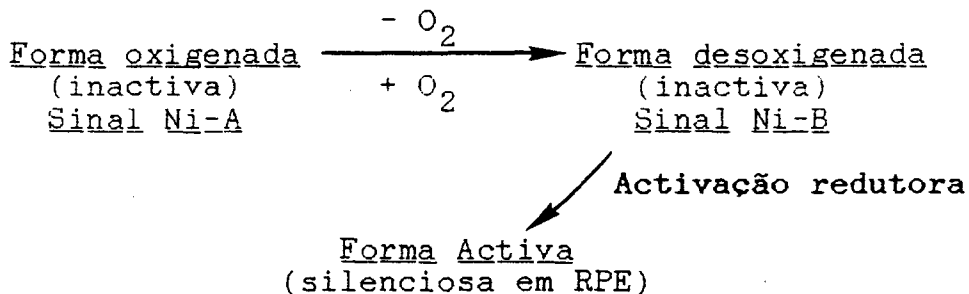
-Grupo B, constituído pelas hidrogenases de *D.salexigens*,

D. desulfuricans (Norway 4, solúvel) e *D. baculatus*. Estas enzimas são praticamente silenciosas em RPE no estado nativo e a sua activação nas reacções de consumo ou produção de hidrogénio e de permuta D_2/H^+ é muito rápida ou mesmo praticamente inexistente. O estado em que são isoladas poderá corresponder ao estado silencioso em RPE das hidrogenases do Grupo A. Outra diferença relevante entre as hidrogenases destes dois grupos reside na razão H_2/HD observada nas reacções de permuta isotópica: as hidrogenases de *D. gigas*, *D. desulfuricans* (ATCC 27774) e *D. multispirans*, do Grupo A, apresentam razões H_2/H^+ inferiores a 1, a pH=7,6, enquanto as hidrogenases de *D. baculatus* e *D. sallexigens*, do Grupo B, contendo selénio em quantidades equimolares com o níquel, apresentam razões superiores a 1 naquelas condições. Esta diferença, como referido anteriormente, pode reflectir o envolvimento do selénio no centro catalítico, eventualmente como o sítio aceitador do protão resultante da cisão heterolítica da molécula de hidrogénio. Tal como para as hidrogenases do Grupo A, as hidrogenases do Grupo B apresentam sinais de RPE Ni-C com valores de g semelhantes e um pouco superiores aos valores dos sinais Ni-C das hidrogenases do Grupo A.

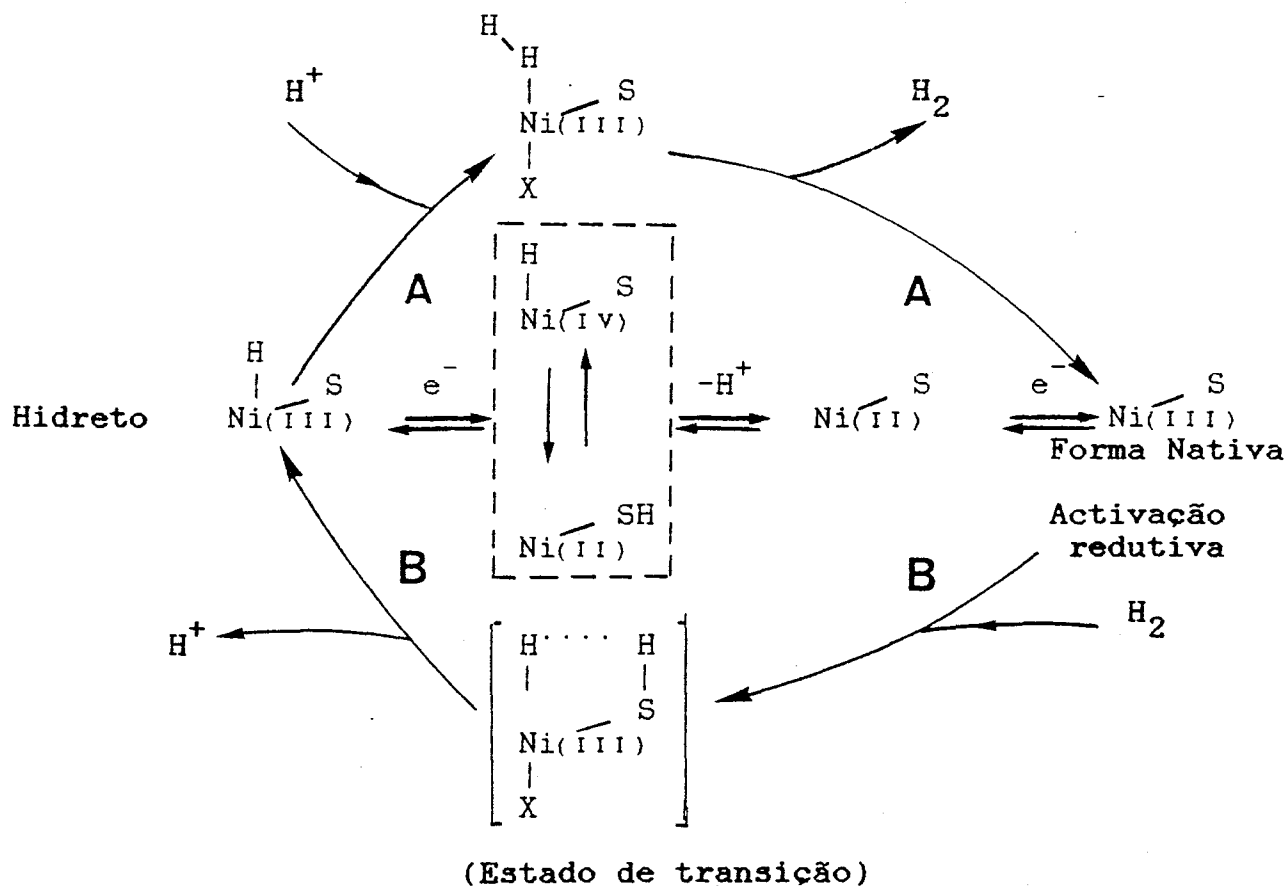
Nos estados reduzidos todas as hidrogenases [NiFe] de *Desulfovibriones* até agora caracterizadas apresentam características espectroscópicas análogas, o que, como já referido, sugere um mecanismo comum de activação e produção/consumo de hidrogénio por estas hidrogenases. Mantendo a hipótese da cisão heterolítica de H_2 , e utilizando como referência os dados adquiridos para a hidrogenase de *D. gigas* e para os modelos funcionais discutidos por Olivé e Olivé (33) e Alvarez e Hofmann (34), propõe-se como

hipótese de mecanismo comum a todas estas hidrogenases um ciclo catalítico em que o centro de níquel é o centro de activação da molécula de hidrogénio (Figura X.6).

CICLO DE ACTIVAÇÃO (Hidrogenases do Grupo A)



CICLO CATALITICO (Hidrogenases dos Grupos A e B)



A - Evolucao de H_2 ; B - Consumo de H_2 ; X - Centro Fe/S (?)

Figura X.6: Ciclos de Activação e catalítico para Hidrogenases [NiFe] de *Desulfovibriones*

O estado correspondente ao sinal a $g=2,19$ (Sinal Ni-C) poderá traduzir um intermediário hidreto, $Ni(III)-H$. O sítio aceitador do próton é definido como um ligando, provavelmente de enxofre, o que poderá explicar as diferenças observadas para as hidrogenases contendo selênio, que substituiria o enxofre naquele papel. A espécie X pode representar um grupo que funciona como estabilizador do estado de oxidação $Ni(III)$, diminuindo o potencial redox para a redução $Ni(III)/Ni(II)$ e, acoplado ao centro de níquel, explicaria a formação do estado silencioso em RPE (X poderá ser um centro $[4Fe-4S]^{1+}$). O esquema catalítico toma também em conta o balanço de prótons e electrões da reacção global de produção ou consumo de hidrogénio (2 electrões e dois prótons). O estado intermediário contendo um ião $Ni(IV)$ é postulado em analogia com o ciclo catalítico de complexos bisditiolenos de níquel (Capítulos II e V). Este ciclo catalítico pode ser precedido de um ciclo de activação para as hidrogenases do Grupo A, semelhante ao proposto para a hidrogenase de *D.gigas*. A função dos centros $[4Fe-4S]$ e $[3Fe-xS]$ seria essencialmente de transferência electrónica entre o centro de níquel e aceptantes ou doadores electrónicos exógenos.

Estes ciclos devem ser encarados essencialmente como hipótese de trabalho, não respondendo ainda a diversas questões, nomeadamente a origem dos sinais de RPE do tipo a $g=2,212$, a forma das curvas de titulação para este sinal e do sinal Ni-C, bem como quais os processos redox envolvidos nestas transições.

X.6-Referências

- 1) M.W.W.Adams, L.E.Mortenson and J.S.Chen, (1981), Biochim. Biophys.Acta, 594, 105-176
- 2) J.LeGall, J.J.G.Moura, H.D.Peck, Jr. and A.V.Xavier, (1982), in "Iron-Sulfur Proteins", ed. T.G.Spiro, John Wiley & Sons, pp.177-246
- 3) W.V.Lalla-Maharajah, D.O.Hall, R.Cammack, K.K.Rao and J.LeGall, (1983), Biochem.J., 209, 445-454
- 4) R.Rieder, R.Cammack and D.O.Hall, (1984), Eur.J.Biochem., 145, 637-643
- 5) M.H.Czechowski, G.Fauque, Y.Berlier, P.A.Lespinat and J.LeGall, (1985), Rev.Port.Quim., 27, 196-197
- 6) M.Teixeira, I.Moura, G.Fauque, M.H.Czechowski, Y.Berlier, P.A.Lespinat, J.LeGall, A.V.Xavier and J.J.G.Moura, (1986), Biochimie, 68, 75-84
- 7) E.C.Hatchikian, M.Bruschi and J.LeGall, (1978), Biochem. Biophys. Res.Comm., 82, 451-461
- 8) J.LeGall, P.O.Ljungdahl, I.Moura, H.D.Peck, Jr., A.V.Xavier, J.J.G.Moura, M.Teixeira, B.H.Huynh and D.V.DerVartanian, (1982), Biochem.Biophys.Res.Comm., 106, 610-616
- 9) J.J.G.Moura, I.Moura, B.H.Huynh, H.J.Krüger, M.teixeira, R.C.DuVarney, D.V.DerVartanian, A.V.Xavier, H.D.Peck, Jr. and J.LeGall, (1982), Biochem.Biophys.Res.Comm., 108, 1388-1393
- 10) M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, D.V.DerVartanian, J.LeGall, H.D.Peck, Jr., B.H.Huynh and J.J.G.Moura, (1983), Eur.J.Biochem., 130, 481-484
- 11) M.Teixeira, I.Mouar, A.V.Xavier, B.H.Huynh, D.V.DerVartanian, H.D.Peck, Jr., J.LeGall and J.J.G.Moura, (1985), J.Biol.Chem.,

260, 8942-8950

12) M.H.Czechowski, B.H.Huynh, M.Nacro, D.V.DerVartanian, H.D.Peck, Jr. and J.LeGall, (1985), Biochem.Biophys.Res.Comm., 125, 1025-1032

13) M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, J.J.G.Moura, G.Fauque, B.Pickrill and J.LeGall, (1985), Rev.Port.Quim., 27, 194-195

14) H.J.Krüger, (1983), Master Thesis, University of Georgia

15) H.J.Krüger, B.H.Huynh, P.O.Ljungdahl, A.V.Xavier, D.V.DerVartanian, I.Moura, H.D.Peck, Jr., M.Teixeira, J.J.G.Moura and J.LeGall, (1982), J.Biol.Chem., 257, 14620-14622

16) B.H.Huynh, M.H.Czechowski, H.J.Krüger, D.V.DerVartanian, H.D.Peck, Jr. and J.LeGall, (1984), Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 81, 3728-3732

17) N.Kojima, J.Fox, R.P.Hausinger, L.Daniels, W.H.Orme-Johnson and C.Walsh, (1983), Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80, 378-382

18) E.G.Graf and R.K.Thauer, (1981), FEBS Lett., 136, 165-169

19) J.R.Lancaster, (1982), Science, 216, 1324-1325

20) B.H.Huynh, J.J.G.Moura, I.Moura, T.A.Kent, J.LeGall, A.V.Xavier and E.Münck, (1980), 255, 3242-3244

21) H.Beinert, M.H.Emptage, J.L.Dreyer, R.A.Scott, J.E.Hahn, K.O.Hodgson and A.J.Thomson, (1983), Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80, 393-396

22) M.H.Emptage, T.A.Kent, B.H.Huynh, J.Rawlings, W.H.Orme-Johnson and E.Münck, (1982), Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 79, 1096-102

23) S.H.Bell, D.P.E.Dickson, R.Rieder, R.Cammack, D.S.Patil, D.O.Hall and K.K.Rao, (1984), Eur.J.Biochem., 145, 645-651

24) B.H.Huynh, D.S.Patil, M.Teixeira, I.Moura, A.V.Xavier, J.J.G.Moura, H.D.Peck, Jr., D.V.DerVartanian and J.LeGall, (1986),

submetido para publicação a J.Biol.Chem.

25) R.Cammack, D.S.Patil R.Aguirre and E.C.Hatchikian, (1982), FEBS Lett., 149, 289-292

26) J.W.van der Zwaan, S.P.J.Albracht, R.D.Fontijn and E.C.Slater, (1985), FEBS Lett., 179, 271-277

27) M.W.W.Admas, S.L.C.Jin, J.S.Chen and L.E.Mortenson, (1986), Biochim.Biophys.Acta, 869, 37-47

28) Y.M.Berlier, G.Fauque, P.A.Lespinat and J.LeGall, (1982), FEBS Lett., 140, 185-188

29) T.Lissolo, S.Pulvin and D.Thomas, (1984), J.Biol.Chem., 259, 11725-11729

30) R.M.Mege and C.Bourdillon, (1985), J.Biol.Chem., 260, 14701-14706

31) V.M.Fernandez, K.K.Rao, M.A.Fernandez and R.Cammack, (1986), Biochimie, 68, 43-48

32) P.A.Lespinat, Y.Berlier, G.Fauque, M.H.czechowski, B.Dimon and J.LeGall, (1986), Biochimie, 68, 55-61

33) H.Olivè and S.Olivè, (1975), J.Mol.Cat., 1, 121-125

34) S.Alvarez and R.Hoffman, (1986) em impressão

APENDICE

Neste Apêndice serão descritas as técnicas experimentais utilizadas neste trabalho. Deu-se particular relevo à Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica, que constituiu a técnica experimental básica da maioria do trabalho realizado.

A.I-Condições gerais de purificação de proteínas

Neste trabalho foram isoladas hidrogenases dos seguintes organismos:

- *Desulfovibrio gigas* (NCIB 9332)
- *Desulfovibrio baculatus* (9974, DSM 1743)
- *Desulfovibrio salexigens* (British Guiana, NCIB 8403)
- *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774)
- *Methanosarcina barkeri* (DSM 800)

(NCIB- National Collection of Industrial Bacteria; DSM- Deutsche Sammlung von Mikro-organism; ATCC- American Type Culture Collection).

As bactérias foram crescidas na Fermentation Plant da Universidade da Georgia (USA), em colaboração com o grupo do Prof.J.LeGall, e na unidade de fermentação do Laboratório de Chimie Bacterienne do Centre National de Recherche Scientifique, em Marselha. Os meios de crescimento utilizados encontram-se descritos nas referências (1,2). Para o enriquecimento isotópico utilizou-se: ferro metálico enriquecido em ^{57}Fe (99,45 %, New England Nuclear), que se adicionou ao meio de cultura habitual, mas desprovido de ferro, após se ter dissolvido em HCl; níquel obtido da Union Carbide Corporation, com um enriquecimento em ^{61}Ni de 88,84 %, adicionado ao meio de cultura após dissolução, numa concentração de 100 $\mu\text{g/l}$.

Os métodos de purificação de cada hidrogenase foram apresentados em detalhe nos Capítulos V-IX. Utilizaram-se técnicas de cromatografia em coluna de três tipos: permuta iônica, adsorção e filtração molecular em gel. Todos os processos foram realizados em colunas termostatizadas à temperatura de 4 °C, usando soluções tampão de Tris/HCL (Tris- tris(hidroximetil)aminometano) ou de fosfato de potássio, ambas a pH=7,6.

A.I.1.-Materiais cromatográficos

Os materiais cromatográficos usados são descritos sucintamente de seguida. Na preparação de cada enchimento seguiram-se as instruções de cada fabricante.

A.I.1.1-Permuta Iônica

Foi utilizada uma resina de permuta aniônica, dietilaminoetil-celulose (DEAE-52, Whatman), que contém grupos amina protonados $-R-NH_3^+$. A separação ocorre devido à diferença de pontos isoelétricos das proteínas. As mais acidicas fixam-se nesta resina, e a sua eluição selectiva consegue-se pela realização de gradientes suficientemente finos de força iônica crescente. Para esta resina usa-se como eluente Tris/HCl a pH 7,6, com forças iônicas entre 10 mM e 1 M. Antes de carregadas com as soluções de proteína, as colunas são cuidadosamente equilibradas a baixa força iônica - Tris/HCl 10 mM.

Utilizou-se ainda uma outra resina de permuta aniônica - DEAE-Biogel A (BIO-RAD), constituída por grupos dietilaminoetil fixados num gel de agarose. Este tipo de enchimento, com propriedades semelhantes a DEAE, revelou-se extremamente eficiente para a separação da hidrogenase.

A.I.1.2-Adsorção

Foi utilizada a hidroxilapatite, uma forma de fosfato de cálcio (BIO-RAD). A coluna é equilibrada à força iônica a que a proteína melhor se fixa, em geral um pouco superior à força iônica a que a proteína é eluída das colunas de DEAE. A eluição faz-se habitualmente diminuindo gradualmente a força iônica em Tris/HCl, até cerca de 1mM e aumentando-a então de novo com soluções tampão de fosfato.

A.I.1.3-Filtração em gel

A filtração em gel permite a separação de proteínas devido à diferença de massas moleculares. Usaram-se colunas de Sephadex G-150 (polidextrano, Pharmacia). A eluição é geralmente efectuada com soluções tampão de Tris/HCL 10 mM. Para a hidrogenase de *D.salexigens* foi também utilizada uma coluna de filtração em gel de HPLC (TSK G 3000 SW, LKB).

A.II-Métodos Analíticos

A.II.1-Determinação de proteína

A concentração total em proteína das soluções foi determinada por dois processos espectrofotométricos: Métodos de Biuret (3) e de Lowry (4).

A.II.1.1-Base dos métodos

As cadeias polipeptídicas das proteínas não absorvem radiação na região do visível. Contudo, na presença de sais de cobre e em solução alcalina formam-se complexos corados, de cor púrpura, que permitem a determinação espectrofotométrica do conteúdo proteico das soluções. Os complexos corados resultam da ligação do ião Cu(II) aos grupos $-C=O$ e $-NH_2$ da cadeia peptídica.

O composto biureto - $\text{H}_2\text{NCONHCONH}_2$ - forma complexos do mesmo tipo, o que originou o nome do Método do Biureto. Este método é relativamente pouco sensível devido ao baixo valor do coeficiente de absortividade molar dos complexos formados, exigindo soluções concentradas de proteína (1 - 20 mg de proteína).

O método de Lowry para além de utilizar também soluções alcalinas de Cu(II) , usa um reagente adicional - Reagente de Folin- que, por reacção com os resíduos tirosina, triptofano e cisteína, leva à formação de um complexo reduzido do ácido fosfomolibdico-fosforotungsténico, de cor azul. Deste modo, a absorção da solução é bastante mais elevada, aumentando-se consideravelmente a sensibilidade do método (25 - 500 μg de proteína).

A.II.1.2-Método do Biureto (3)

Soluções - Reagente Biureto: Dissolvem-se 1,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 6 g de tartarato de sódio ou potássio em 500 ml de água destilada. Adiciona-se, com agitação constante, 300 ml de uma solução de NaOH a 10 % (p/v) e afere-se a 1000 ml com água destilada.

Doseamento - A 1 ml de solução contendo 1 a 10 mg de proteína adiciona-se 4 ml de Reagente de Biureto e agita-se; ao fim de 1/2 h determina-se a absorvância a 550 nm, usando-se como referência uma solução contendo 1 ml de água destilada e 4 ml de Reagente de Biureto. A recta de calibração é construída usando soluções padrão de albumina de soro bovino (Sigma), contendo entre 0 e 10 mg de proteína.

A.II.1.3- Método de Lowry (4)

Soluções - Reagente A: Solução de Na_2CO_3 a 2 % (p/v) em

NaOH 0,1 N. Reagente B: Solução de CuSO_4 a 0,5 % (p/v) em tartarato de sódio ou potássio a 1% (p/v). Reagente C: Solução alcalina de cobre, preparada apenas na altura de se efectuar a análise, misturando-se 50 ml de solução A e 1 ml de solução B. Reagente E: Reagente de Folin diluído 1:2.

Doseamento - A 1 ml de solução contendo 10 a 50 μg de proteína junta-se 5 ml do reagente C e agita-se. Ao fim de 10 min adiciona-se 0,5 ml do reagente E e, ao fim de 30 min, determina-se a absorvância da solução a 750 nm. Usa-se como referência uma solução contendo 1 ml de água destilada e os reagentes C e E. A recta de calibração obtém-se a partir de soluções padrão de albumina do soro bovino (Sigma) contendo 0 a 100 μg de proteína.

Para ambos os métodos as rectas de calibração foram obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

A.II.2- Determinação de metais

O conteúdo em metais das enzimas estudadas foi determinado por diversos métodos: espectrofotometria (Método do TPTZ -Fe-), absorção atômica (Ni), com a colaboração do Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico (Eng. Legrand de Moura) e emissão de plasma (Fe, Ni e Se), em colaboração com a Universidade da Georgia, USA.

A.II.2.1-Determinação de Fe- TPTZ

O TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) é um dos complexantes de Fe(II) com maior coeficiente de absorvidade, permitindo, por isso, uma determinação espectrofotométrica de ferro com elevada sensibilidade. A formação do complexo corado ocorre apenas para

Fe(II), pelo que é possível determinar apenas este ião sem interferência de Fe(III). Para uma determinação total de ferro numa proteína é necessário reduzi-lo todo à forma de Fe(II).

Por precipitação da enzima em meio ácido - ácido tricloroacético - e adição de ácido clorídrico libertam-se os iões ferro. Após centrifugação, acerta-se o pH da solução sobrenadante a pH = 4,3 com uma solução de acetato de amónio e os iões Fe(III) são reduzidos a Fe(II) com uma solução de hidroxilamina; por adição da solução de TPTZ formam-se os complexos corados.

Soluções - a: HCl 8 N ; b: TCA a 80% (p/v); c: TPTZ 0,004 M, preparada por dissolução de 64,4 mg de TPTZ em 1 ml de HCl 2 N e diluição a 50 ml com água destilada; d: $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ a 10 % ; e: Acetato de amónio a 75 % (p/v); f: Soluções padrão de ferro preparadas a partir de sulfato ferroso amoniacal.

Doseamento - As diversas soluções são sempre feitas em tubos de plástico livre de ferro ou em tubos de vidro descontaminados. Pipetam-se 0.4 ml das soluções a dosear, contendo 3 a 25 nmoles de ferro, para tubos de plástico. Usa-se como branco 0,4 ml de água. Adiciona-se a cada tubo 50 ul de HCl 8 N e mistura-se num vortex. Após 10 min de repouso, com agitação ocasional, junta-se 50 ul de TCA a 80% e remove-se a proteína por centrifugação. Transferem-se 0,4 ml da solução sobrenadante de cada solução para um tubo de plástico e adiciona-se 100 ul de acetato de amónio a 75%, 40 ul de hidroxilamina a 10% e, após agitação, 40 ul da solução de TPTZ. Agita-se novamente e, ao fim de 10 min, determina-se a absorvância da solução a 593 nm. A recta de calibração é efectuada com as soluções padrão referidas, ajustando-se os pontos experimentais por regressão linear pelo método dos

minimos quadrados.

A.II.2.2-Determinação de Ni por absorção atômica

A determinação de níquel por absorção atômica foi realizada pelo Laboratório de Análises do IST. A destruição de matéria orgânica foi efectuada por ataque com H_2O_2 e HNO_3 . Usaram-se como padrões soluções de Ni^{2+} entre 0,25 e 5 ppm, que foram utilizadas para o traçado da recta de calibração (por regressão linear). A lampada de cátodo oco emitia a 232 nm e utilizou-se ainda um corrector de deutério. O limite de detecção do método utilizado era de 0,1 ppm de níquel.

A.II.2.3-Determinação de Fe, Ni e Se por Emissão de plasma

Para algumas amostras de hidrogenase o conteúdo em ferro, níquel e selénio foi determinado por espectrofotometria de emissão de plasma, em colaboração com a Universidade da Georgia.

A.II.3- Electroforese

A técnica de electroforese foi utilizada para dois fins distintos: verificação do estado de pureza das enzimas após a sua purificação e determinação de massas moleculares das subunidades das proteínas. Em ambos os casos efectuou-se a electroforese em geis de poliacrilamida a 7% (limite de exclusão de cerca de 1000 kDa), em aparelhos verticais com capacidade para oito geis.

A.II.3.1-Pureza das enzimas (6)

Em princípio, enzimas diferentes devem migrar a velocidades diferentes sob a acção de um campo eléctrico. Assim, uma preparação pura deve apresentar apenas uma banda no gel, depois de corado; no caso de se detectarem várias bandas, a sua

intensidade relativa fornece uma estimativa qualitativa do estado de pureza da enzima.

Técnica experimental

A) Soluções- I-Preparação dos geis

A: HCl 1 N - 48 ml; Tris - 36,3 g; Tetrametilenodiamina (TEMED)- 0,25 ml; água destilada - 100 ml. C: Acrilamida - 28 g; NN' bisacrilamida - 0,735 g; água destilada - 100 ml. (Estas soluções devem ser guardadas no frio, pelo período máximo de seis meses). G: Persulfato de amônio - 0,14 g; água destilada - 100 ml (esta solução deve ser preparada apenas na altura de fazer os geis.)

II: Solução tampão - Tris / Glicina: Tris - 3 g; glicina- 14,4 g; água destilada - 1000 ml. (Esta solução deve ser diluída 10 vezes antes de usar.)

III: Solução corante: Azul de Coomassie (R 250) - 1,25 g; Metanol - 450 ml; ácido acético glacial - 46 ml

IV: Solução descorante; Metanol - 50 ml; ácido acético glacial - 75 ml; água destilada - 875 ml

B) Soluções de proteína - Usam-se geralmente 40 µl de solução constituída por 10 µl de solução saturada de sacarose, 10 µl de azul de bromofenol e 20 µl de solução de proteína em estudo.

C) Procedimento - Para a preparação de oito geis de poli-acrilamida a 7% misturam-se as soluções A, C e G nas seguintes proporções: A - 4 ml; C - 4 ml; G - 8 ml.

Esta mistura é então colocada em pequenos tubos de vidro de 0,5 cm de diâmetro e cerca de 8 cm de altura, de modo a que o gel atinja um comprimento de cerca de 7 cm. A superfície da solução coloca-se um pouco de água ou glicerol para que a super-

fície do gel fique horizontal. Após a gelificação retira-se a água do topo e colocam-se os tubos no aparelho de electroforese vertical, em cujo compartimento inferior foi previamente colocada a solução tampão. Introduz-se então a solução de proteína e, no topo desta e até atingir a superfície superior do tubo, introduz-se cuidadosamente solução tampão. Enche-se em seguida o compartimento superior do aparelho com solução tampão e ligam-se os electrodos à fonte de tensão (400 Volt). Após cerca de três horas desliga-se a fonte de tensão e retiram-se os geis, deixando-os em tubos de ensaio com a solução corante durante uma hora. Mudam-se então os geis para a solução descorante. Em geral a descoloração ocorre ao fim de 12-24 h.

A.II.3.2- Determinação de massas moleculares de subunidades (7,8)

A migração de uma proteína num gel sob a acção de um campo eléctrico depende da sua carga, massa molecular e forma. Para que seja possível estabelecer uma correlação entre a migração e a massa molecular é, pois, necessário uniformizar a carga e a forma das proteínas. Esta uniformização pode ser conseguida através da utilização de detergentes apropriados, dos quais o mais vulgarmente utilizado é o sulfato dodecilico de sódio (SDS). Este composto é um detergente aniónico que forma complexos micelares com as proteínas, por ligação aos grupos catiónicos da cadeia polipeptídica. Em geral, a taxa de associação do SDS às proteínas é aproximadamente constante, embora se verifiquem algumas excepções, frequentemente associadas a proteínas muito acidicas (como a maioria das ferredoxinas) ou com ligações dissulfureto. Estas últimas podem ser quebradas em condições redutoras, na presença

de ditionitritol ou mercaptoetanol e com aquecimento. O SDS tem também a propriedade de cindir ligações não covalentes, levando ao desdobramento de proteínas globulares e à dissociação de proteínas oligoméricas. Os agregados micelares SDS/proteína são de carga uniforme e forma alongada, de comprimento proporcional à massa molecular da proteína, pelo que a sua migração electroforética será função apenas da massa molecular de cada proteína. Verifica-se que existe uma correlação linear entre aquela mobilidade e o logaritmo da massa molecular, sendo assim possível determinar a massa molecular de proteínas monoméricas ou das subunidades de proteínas oligoméricas, correndo simultaneamente proteínas padrão, de massa molecular conhecida.

Técnica Experimental

A) Soluções - I - Preparação dos geis

A: Solução tampão de fosfato de sódio 0,6 M - 83,5 ml; Tetrametilenodiamina - 0,25 ml; Sulfato dodecilico de sódio (SDS)- 0,5 g; Ureia - 15 g; água destilada - 150 ml. B: Acrilamida - 50 g; NN' bismetilacrilamida - 1,35 g; água destilada - 300 ml

II: Solução tampão: Solução de Na_2HPO_4 0,5 M - 355 ml; Solução de NaH_2PO_4 0,5 M - 145 ml; Sulfato dodecilico de sódio - 25 g; água destilada - 2,5 l

III: Soluções corante e descorante - Idênticas às indicadas no método anterior, excepto no uso de azul de Coomassie (G-250).

B) Soluções de proteína - As soluções são preparadas como no método anterior. No caso de se desejar quebrar as pontes dissulfureto, adiciona-se mercaptoetanol de modo a que a solução

final tenha uma concentração de tiol de 0,1 % (v/v), e aquece-se a 100 °C durante 5 min.

C) Procedimento- Para a preparação de oito geis a 7,5% misturam-se num Erlenmeyer as seguintes soluções: A - 6 ml. Aquece-se até ocorrer a completa dissolução. B - 9 ml .

Adicionam-se 5 ml de água destilada e 14-20 mg de persulfato de amónio. Enchem-se de seguida os tubos de vidro, procedendo-se como indicado no método anterior. A fonte de tensão deve ser regulada de modo a se atingir uma corrente de 10 mA por cada gel. Após a coloração e descoloração dos geis determina-se o R_f de cada banda e calcula-se a recta de calibração por regressão linear pelo método dos minimos quadrados.

A.II.4-Determinação de Massas Moleculares por filtração em gel

A massa molecular da hidrogenase de *Ms.barkeri* foi determinada por filtração em gel (Sephadex G-200), numa coluna (1x100 cm) equilibrada com uma solução tampão de fosfato 0,02 M, pH 7,6 e 1 M em NaCl, segundo o método de Whitaker (9). O volume morto da coluna é calculado com azul de Dextran. A calibração foi efectuada com diversas proteínas de massa molecular conhecida - albumina (45 kDa), aldolase (158 kDa), catalase (240 kDa) e ferritina (450 kDa). O conteúdo em proteína foi estimado pela absorção a 280 nm. A curva de calibração foi obtida por regressão linear, sabendo que existe uma relação linear entre o logaritmo da massa molecular e o R_f de cada proteína (razão entre o respectivo volume de eluição e o volume morto da coluna). Para as hidrogenases de *D.baculatus* as massas moleculares foram determinadas por filtração em gel em coluna de HPLC (TSK G 3000, LKB).

A.III-Titulação Redox

A.III.1-Técnica

As titulações redox realizadas neste trabalho foram seguidas por RPE, ou seja, aos valores de potencial obtidos ao longo da titulação, transferiam-se cerca de 200 μ l de solução para tubos de RPE, que eram imediatamente congelados a 77 K para posterior medida no espectrómetro.

As titulações foram realizadas na célula anaeróbica representada esquematicamente na figura A.1, semelhante à descrita por Dutton (10).

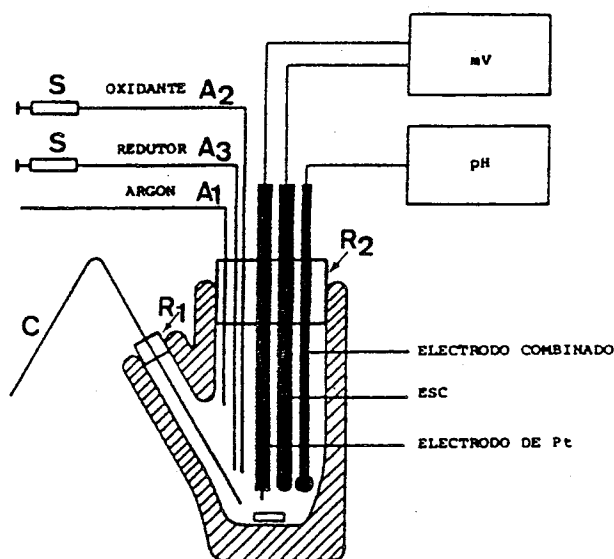


Figura A.1 : Célula de Titulação Redox
A-Agulhas; C-Canula de transferência
R-Septums de borracha; S-Seringas

A célula pode ser hermeticamente fechada através de septums de borracha R_1 e R_2 . Através do septum superior introduzem-se três electrodos: electrodo de pH, electrodo de trabalho de platina e electrodo de referência (electrodo saturado de calomelanos). Pela agulha A_1 passa continuamente uma corrente de gás inerte (argon ou azoto), que além de permitir estabelecer uma atmosfera anaeróbica no interior da célula, cria a pressão neces-

sária para retirar as amostras pela canula C. Esta canula é a única abertura para o exterior, através da qual, quando emersa na solução, se extraem as amostras. Os titulantes são adicionados pelas agulhas A₂ e A₃, às quais se ajustam seringas "gas tight". A solução é continuamente agitada electromagneticamente.

No caso das titulações com agentes químicos usaram-se as seguintes soluções titulantes:- ditionito de sódio 0,2 M em solução tampão de Tris/HCl 50 mM, pH=9; - ferricianeto de potássio 0,2 M, na mesma solução tampão. Para as titulações realizadas apenas na presença de hidrogénio, em que este gás é utilizado como redutor, introduzia-se o gás por uma das agulhas A₂ ou A₃, fechando-se a outra. Em ambos os casos a titulação foi feita na presença de mediadores redox, com potenciais de oxidação redução na gama desejada, numa concentração final 80 uM (Tabela A.1).

No início das titulações os eléctrodos foram calibrados, usando uma solução saturada de quinohidrona a pH=7, sabendo que o seu potencial em relação ao eléctrodo de hidrogénio padrão é dado por:

$$E_Q = 0,6998 - 0,059 \text{ pH} \quad (\text{Volt})$$

Os valores de potencial obtidos podem então ser corrigidos, sabendo que o potencial do eléctrodo de calomelanos em relação ao eléctrodo de hidrogénio é de 0,241 Volt.

As misturas reaccionais usadas tinham habitualmente um volume total de 5 ml, sendo constituídas por 1,5 ml de mistura de mediadores e solução de proteína e de tampão num volume total de 3,5 ml. A concentração final de proteína variou, conforme os casos, de 24 uM a 100 uM.

Tabela A.1: Mediadores redox utilizados nas titulações

Mediador	E_o (mV)
diclorofenolindofenol	217
dimetilfenoquinona	180
fenazina metasulfato	80
Azul de metileno	11
Indigo tetrasulfonato	-46
piocianina	-60
2-hidroxi-2,4 naftoquinona	-145
antroquinona 2,7 disulfonato	-182
fenosafranina	-255
safranina T	-289
benzilviologênio	-311
metilviologênio	-436
m Triquat Br^-	-540
m dimetiltriquat Br^-	-617

O potencial era ajustado adicionando-se pequenas quantidades de redutor ou oxidante (titulação com agentes químicos) , ou por variação das pressões parciais de hidrogênio e gás inerte (titulação com H_2). Após estabilização a cada valor de potencial, retirava-se uma amostra. Nas titulações com hidrogênio, verificou-se que se obtinha uma maior estabilização dos valores de potencial começando por incubar a solução sob hidrogênio ao valor de potencial mais negativo, durante cerca de 90 min, e começando então lentamente a reoxidação da enzima diminuindo progressiva-

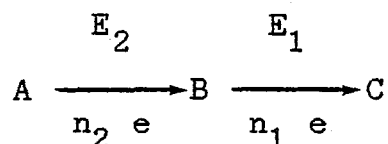
mente a pressão parcial de hidrogênio.

A.III.2-Análise das curvas de titulação

Neste trabalho tentou-se o ajuste dos dados das titulações redox a curvas de Nernst teóricas. As curvas de titulação para os sinais de RPE presentes no estado nativo da hidrogenase de *D.gigas* (Sinal Ni-A e sinal isotrópico a $g=2,02$) foram ajustadas a curvas de Nernst para processos monoelectrônicos, determinando-se assim os valores de E'_0 .

Os resultados obtidos para os sinais intermediários gerados sob hidrogênio (Sinal Ni-C e sinal a $g=2,21$) para as hidrogenases de *D.gigas*, *D.salexigens* e *D.baculatus* (citoplásmica) indicam que estas espécies existem numa gama de potenciais muito estreita (entre cerca de -300 e - 450 mV), o que sugere a ocorrência de dois processos redox consecutivos. Assim, foram calculadas curvas teóricas para este tipo de processos.

Considere-se a seguinte sequência de reacções redox:



e sejam P_A , P_B e P_C as fracções das espécies A, B e C em solução

$$P_A + P_B + P_C = 1$$

Podem escrever-se equações de Nernst para estas reacções (supondo para simplificação $t=25^\circ\text{C}$)

$$E = E_1 + \frac{0.059}{n_1} \text{Log} (P_B/P_C)$$

$$E = E_2 + \frac{0.059}{n_2} \text{Log} (P_A/P_B)$$

Para cada ponto de equilíbrio ter-se-á

$$E_1 + \frac{0.059}{n_1} \text{Log} (P_B/P_C) = E_2 + \frac{0.059}{n_2} \text{Log} (P_A/P_B)$$

Esta equação pode rearranjar-se, explicitando P_B . Consideraram-se três casos, numa tentativa de obter um bom ajuste das curvas teóricas aos pontos experimentais :

Processos monoelectrônicos, $n_1=n_2=1$

$$P_B = (-1 \pm (1 + 4 (10^{\Delta E/0.059}) (1-P_A)/P_A) / (2 (10^{\Delta E/0.059})/P_A)$$

Processos bielectrônicos, $n_1=n_2=2$

$$P_B = (-1 \pm (1 + 4 (10^{\Delta E/0.0245}) (1-P_A)/P_A) / (2 (10^{\Delta E/0.0245})/P_A)$$

Processo monoelectrónico seguido de processo bielectrónico,

$$n_2=1, n_1=2$$

Neste caso é necessário encontrar a raiz do polinômio de 3^o grau, para P_B entre 0 e 1:

$$P_B^3 10^{\Delta E/0.03} + P_B P_A^2 + P_A^2 (P_A - 1) = 0$$

Em qualquer destes casos, P_B é calculado em função de ΔE e P_A , a diferença de potenciais entre ambos os processos

$$\Delta E = E_1 - E_2$$

Sabendo então P_B e P_A podem calcular-se os potenciais de equilíbrio através da equação de Nernst e P_C através da relação

$$P_C = 1 - P_A - P_B$$

O valor máximo para P_B é controlado pelo valor de E , enquanto a forma das curvas é controlada por este parâmetro e por n_1 . Os resultados obtidos apresentam-se na tabela A.2.

Tabela A.2: Valor de P_B para vários valores de ΔE e n_i

n_i	ΔE	P_B (max)
$n_1=n_2=1$	0	0,332
	- 10	0,374
	- 20	0,423
	- 30	0,469
	- 40	0,512
	- 50	0,565
	- 60	0,612
$n_1=n_2=2$	0	0,332
	- 10	0,423
	- 20	0,514
	- 30	0,612
	- 40	0,690
	- 50	0,770
$n_1=2, n_2=1$	0	0,340
	- 10	0,406
	- 20	0,468
	- 30	0,530
	- 40	0,586

Ensaaiaram-se também outros tipos de curvas de Nernst, envolvendo múltiplos processos redox (até cinco espécies), consecutivos, mono ou bielectrônicos. Embora se consiga um melhor ajuste aos pontos experimentais, não é possível com os dados

espectroscópicos disponíveis correlacionar este tipo de ajuste com processos detectados por RPE, pelo que os resultados obtidos não são apresentados.

Na figura A.2 mostram-se alguns exemplos das curvas obtidas, sobrepostas aos valores experimentais para as titulações da hidrogenase de *D.gigas*.

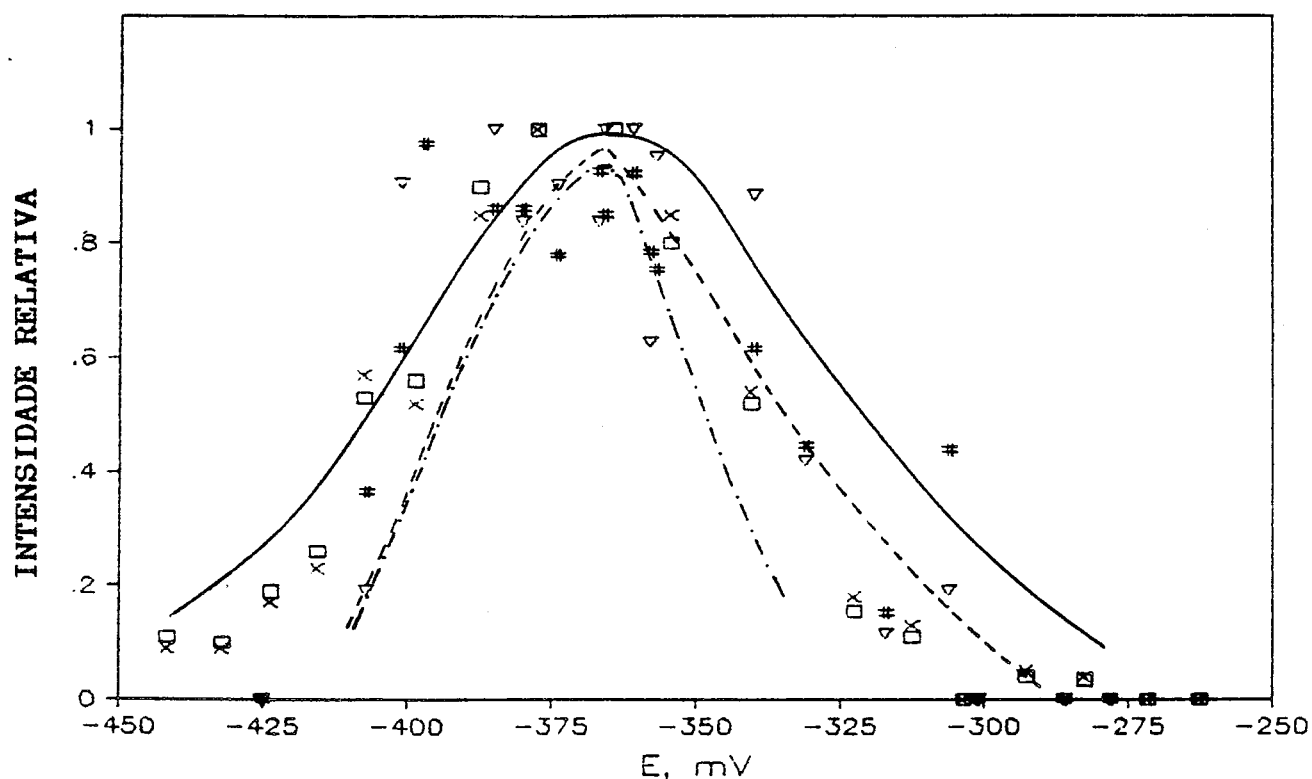
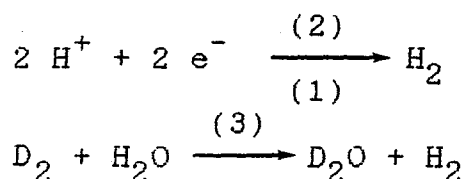


Figura A.2: Curvas de titulação do sinal Ni-C (valores de g a 2,19 , 2,14 e 2,01) da hidrogenase de *D.gigas*
 (□) e (X) - Titulação com hidrogênio
 (▽) e (#) - Titulação com ditionito de sódio
 Curvas teóricas: $n_1=n_2=1$; $n_1=2, n_2=1$; $n_1=n_2=2$

A.IV-Determinação da Actividade Hidrogenase

A actividade da enzima hidrogenase é determinada utilizando as reacções catalisadas por esta enzima: oxidação de hidrogênio (Consumo de H_2 , 1), redução de H^+ (Produção de H_2 , 2) e

permuta H/D (3):



A unidade de actividade especifica é definida como o número de micromoles de gás (D_2 , HD ou H_2) produzido ou consumido por unidade de tempo (minuto) e de massa de proteína (mg):

- produção : $\mu\text{moles H}_2 \text{ (produzido).min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$
- consumo : $\mu\text{moles H}_2 \text{ (consumido).min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$
- permuta : $\mu\text{moles D}_2 \text{ (consumido).min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$
- $\mu\text{moles (HD+H}_2\text{)(produzidos).min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$

As determinações foram realizadas em colaboração com o grupo do Prof. J.LeGall, no departamento de Bioquímica da Universidade da Georgia e na Equipe Commune d' Enzymologie em Cadarsache. Utilizaram-se dois processos diferentes para a quantificação dos gases: cromatografia de fase gasosa e espectrometria de massa.

A.IV.1-Produção de H_2

Meio Reaccional

Foi utilizado o método descrito por Peck e Gest (11). Mede-se a produção de hidrogénio na presença de um transportador de electrões - metil viologénio (1 mM)- reduzido por um doador de electrões - ditionito (15 mM)-. A reacção faz-se em frascos de soro de 15 ml contendo Tris/HCl 50 mM a pH 7,6 e albumina de soro bovino (0,5 mg/ml). O volume total da mistura reaccional é de 3 ml. Estes frascos podem ser previamente preparados em atmosfera inerte (Argon ou Azoto), selados com rolhas de borracha e cápsulas de alumínio e congelados até à sua utilização.

Técnica Experimental

A mistura reaccional no frasco é agitada em banho de água a 32 °C durante 20 min. Adiciona-se então a hidrogenase, através de uma seringa e, a intervalos de tempo regulares, retiram-se amostras da fase gasosa (250 µl) por intermédio de uma seringa de gases. Estas amostras são injectadas num cromatógrafo de fase gasosa.

Cromatógrafo

O cromatógrafo utilizado em Cadarache - Aerograph A90-P₃-, estava equipado com uma coluna de peneiro molecular (13 X) e com um detector de condutividade térmica. O gás arrastador era Argon e a temperatura do forno era de 80 - 100 °C.

Na universidade da Georgia foi utilizado um cromatógrafo Varian 4600, com uma coluna de "Molecular sieves" do tipo 5A e usando uma mistura de metano (5%) e argon (95%) como gás arrastador. A temperatura do forno era de 105 °C. O método tem uma sensibilidade de 0,25 a 8 µmoles de H₂.

A.IV.2-Consumo de H₂

A actividade hidrogenase no consumo de H₂ foi determinada na presença de aceitadores de electrões - benzil viologénio ou azul de metileno-. O meio reaccional, preparado também em frascos de soro sob atmosfera inerte, continha Tris/HCl 100 mM a pH 8,0 , albumina de soro bovino (0,5 mg/ml), EDTA (1 mM) e o aceitador de electrões (10 mM), num volume total de 3 ml. Após incubação sob argon durante 15 min e adição de hidrogénio (200 µl) equilibra-se a mistura 20 min à temperatura de 32 °C e adiciona-se a enzima . Como referido no método anterior, a inter-

valos de tempo regulares retiram-se amostras da fase gasosa para posterior análise no cromatógrafo.

A.IV.3-Permuta D_2/H^+

Para o estudo da reacção de permuta, o meio reaccional é constituído apenas por 10 ml de Tris/HCl 50 mM a pH 7,6 saturado com uma mistura gasosa de Argon e Deutério (80 e 20 %, respectivamente). As medidas foram efectuadas na célula representada na figura A.3, que permite análises contínuas de gases dissolvidos através de um espectrómetro de massa. Este sistema permite ainda um controlo contínuo do teor em oxigénio (pico de massa 32).

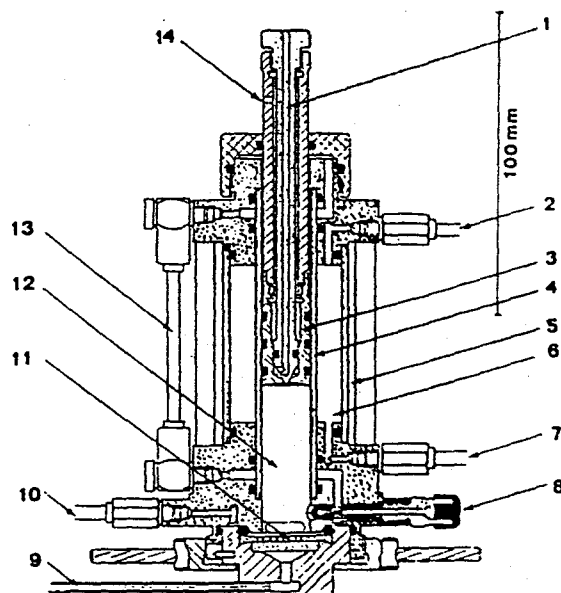


Figura A.3: Reactor usado para a reacção de permuta D_2/H^+ (12)

O reactor consiste num tubo de vidro mantido entre dois blocos de aço inoxidável (4). Um tubo externo (5) limita um cilindro (6), concêntrico com o anterior, que permite a termostatização do sistema por circulação de água (2,7). A solução (12) é

continuamente agitada por uma barra magnética e pode ser saturada com a mistura gasosa por intermédio de uma agulha hipodérmica introduzida no septum (8), situado na base do reactor. Quando a solução se encontra saturada, o que é controlado por medição continua no espectrómetro de massa, o pistão (3) é introduzido no interior do reactor, eliminando a atmosfera gasosa através do canal central (1), que é depois fechado por uma válvula de agulha. Os gases dissolvidos difundem pela membrana de Teflon (11), na base do reactor, até uma linha sob vácuo (9) directamente ligada ao espectrómetro. A hidrogenase é introduzida através do septum, seguindo-se então, em intervalos de tempo muito curtos, o consumo de D_2 e a produção de HD e H_2 (picos de massa 4, 3 e 2, respectivamente).

Utilizando-se as misturas reaccionais descritas nos métodos anteriores e variando correspondentemente as fases gasosas é também possível determinar por espectrometria de massa as actividades de consumo ou produção de hidrogénio. Foi este o processo usado no estudo da dependência da actividade das hidrogenases com o pH.

A.V.-Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica (13-17)

A espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica baseia-se essencialmente nas propriedades magnéticas do electrão. Estas propriedades dependem da vizinhança molecular dos electrões desemparelhados (núcleos e electrões próximos), pelo que este método espectroscópico permite obter informações sobre a estrutura, composição e configuração electrónica dos centros paramagnéticos. Por outro lado, devido à sua especificidade- apenas

centros paramagnéticos são detectáveis por RPE- permite estudar especificamente estes centros, o que é extremamente útil em sistemas complexos, contendo diversos centros metálicos, como é o caso da enzima hidrogenase.

Outra característica importante desta técnica é a possibilidade de quantificar os espectros obtidos, possibilitando assim correlacionar estes sinais com dados de composição química das amostras em estudo. Por último, outras duas características são ainda de mencionar: é uma técnica bastante sensível (concentrações em spin da ordem de 20 uM podem ser ainda detectadas), podendo ser utilizados pequenos volumes de amostra (em geral, cerca de 200 ul), e não destrutiva.

A.V.1-Noções básicas

O electrão possui um momento angular intrínseco- o momento angular de spin S, caracterizado pelo número quântico de spin S e com o valor próprio de 1/2. A sua projecção segundo o eixo de precessão do electrão (eixo dos zz) é caracterizada pelo número quântico magnético de spin m_s , que pode tomar os valores de $\pm 1/2$. Sendo o electrão uma partícula carregada, o seu momento angular de spin está associado a um momento magnético μ . A experiência de RPE baseia-se essencialmente nas características deste momento magnético. Considerando apenas a projecção segundo o eixo dos zz, μ pode tomar os valores:

$$\mu_z = - \beta g_e m_s$$

ou seja,

$$\mu_z = \pm 1/2 \beta g_e$$

onde β é o magnetão de Bohr ($9,274 \times 10^{-21}$ erg.G⁻¹) e g_e é o

factor g para o electrão livre ($g_e = 2,00232$).

Na ausência de um campo magnético externo, os níveis de energia correspondentes aos dois valores de m_s são degenerados. Contudo, por aplicação de um campo magnético H_0 esta degenerescência pode ser levantada, sendo a energia de cada estado de spin dada por

$$E = - \mu_z H_0$$

ou

$$E = \pm 1/2 g_e \beta H_0$$

A diferença de energia entre cada estado é igual a

$$\Delta E = g_e \beta H_0$$

Este desdobramento dos níveis de spin electrónico é geralmente designado por Efeito de Zeeman. Por aplicação de radiação electromagnética de frequência apropriada

$$h\nu = \Delta E = g_e \beta H_0$$

podem-se induzir transições entre os níveis de spin, por interacção entre o momento magnético de spin e a componente magnética da radiação, obedecendo à regra de selecção

$$\Delta m_s = \pm 1$$

Esta transição constitui a base fundamental da espectroscopia de RPE. A maioria dos espectrómetros de RPE utilizam uma frequência fixa, , efectuando-se um varrimento de campo magnético. As linhas de absorção aparecerão aos valores de campo magnético que satisfaçam a condição

$$H_r = \frac{h \nu}{g_e \beta}$$

A.V.2-Parâmetros de RPE

Um espectro de RPE é caracterizado por diversos parâmetros, que traduzem a vizinhança do paramagneto em estudo:

- posição da linha espectral (linha de ressonância), dada pelo factor g:

$$g = h \nu / \beta H_r = 714.44 \quad \nu(\text{GHz}) / H (\text{Gauss})$$

- estrutura sobreposta ao envelope espectral básico, resultante de - i) Interacção hiperfina do momento angular de spin electrónico com o momento angular de spin do núcleo do paramagneto, caracterizada pela constante de acoplamento hiperfino A; ii) Interacção superhiperfina, entre o momento angular de spin electrónico e o momento angular de spin de núcleos vizinhos, caracterizado também pela constante A; iii) Interacção spin-spin, de natureza dipolar ou de permuta, entre electrões desemparelhados no mesmo ião ou em iões vizinhos;

- número de spins que contribuem para a ressonância (quantificação do sinal);

- Tempos de relaxação- Como se verá adiante, é importante trabalhar em condições às quais a velocidade de transição induzida pela radiação de microondas não compete com o processo natural de relaxação, ou seja, em que condições às quais a intensidade do sinal seja independente da potencia da radiação de microondas.

A.V.2.1-Factor g

Este parâmetro especifica a grandeza da interacção de um electrão com o campo magnético aplicado. Para os radicais livres, o electrão encontra-se geralmente deslocalizado e, como o número

atômico dos átomos dos radicais são pequenos, a constante de acoplamento spin-orbita é pequena, pelo que a contribuição para o momento magnético total do sistema resulta quase exclusivamente do spin electrónico. Assim, o valor de g destes radicais tem valores próximos do valor para o electrão livre, ou seja, perto de 2. Pelo contrário, em iões de metais de transição o electrão desemparelhado está localizado essencialmente nestes iões; a constante de acoplamento spin-orbita é elevada, pelo que o momento magnético efectivo do electrão apresenta uma forte contribuição devido ao momento angular orbital (paramagnetismo orbital). Nesta situação, o valor de g pode desviar-se apreciavelmente de 2. Devido à contribuição do momento angular orbital o momento magnético total dependerá da orientação de cada molécula no campo magnético. Sendo g a manifestação espectroscópica do momento magnético, este factor será dependente da orientação: o factor g é anisotrópico, sendo definido por um tensor.

A.V.2.2-Constante de acoplamento hiperfino

Os momentos de spin nucleares originam campos magnéticos locais que se fazem sentir no electrão, o qual, assim, estará sujeito a um campo magnético efectivo diferente do campo aplicado H_o :

$$H_{ef} = H_o + H_{loc}$$

onde

$$H_{loc} = h A / (g \beta M_I)$$

sendo A a constante de acoplamento hiperfino. Para que H_{loc} seja não nulo é necessário que o momento angular de spin nuclear seja superior a 0: o valor de I depende do número de prótons e

neutrões do núcleo, ou seja, do seu número e massa atômicos-
núcleos com massa atômica ímpar têm spin semi-inteiro, enquanto
núcleos com massa atômica par e número atômico ímpar têm spin
inteiro. Os restantes núcleos têm $I=0$.

As linhas do espectro de RPE são desdobradas em $2I+1$
linhas, correspondentes à multiplicidade de spin nuclear. A
distância entre cada linha hiperfina é igual ao valor de A ,
medido em unidades de campo magnético. A constante de desdobra-
mento hiperfino pode também ser expressa em unidades de energia.
Por exemplo, para um ião Ni(III) ($S=1/2$), os espectros de RPE com
os isótopos mais abundantes, de $I=0$ (^{58}Ni e ^{60}Ni) e com o isótopo
 ^{61}Ni ($I=3/2$) são mostrados na figura A.4, observando-se o desdo-
bramento das linhas de RPE em $2I+1=4$ linhas.

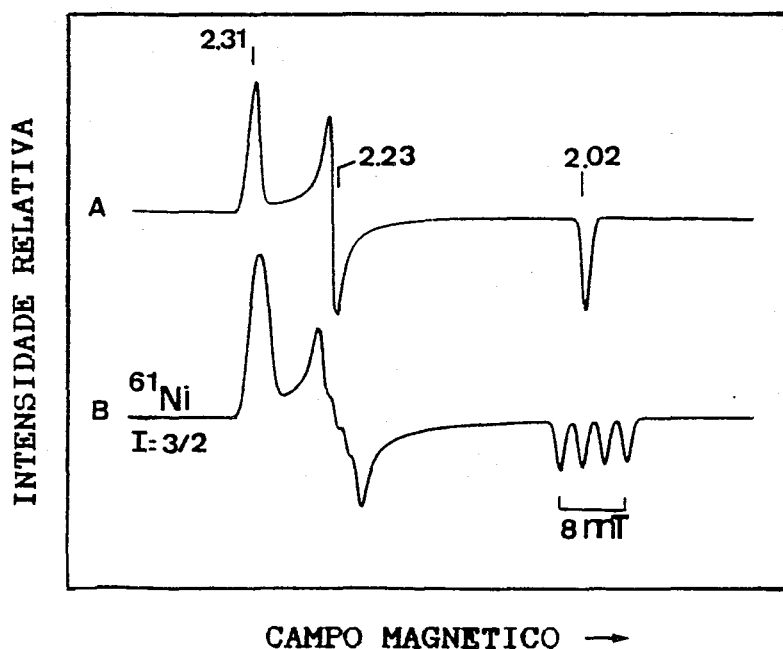


Figura A.4: Espectros de RPE de níquel, de isótopos com
 $I=0$ (A) e com $I=3/2$ (B)
Sinais simulados, usando os valores dos sinais de RPE da
hidrogenase de *D.gigas* (Tabela V.5)

A interacção hiperfina é em geral anisotrópica, o que resulta do facto desta interacção ser composta de duas partes: uma componente isotrópica resultante de uma interacção de contacto entre o electrão e o núcleo e uma componente anisotrópica que reflecte a interacção espacial. Como o electrão reside em orbitais com propriedades direccionais específicas, a interacção espacial é também direccional.

A.V.2.3-Interacção spin-spin

A existência de mais de um electrão desemparelhado confinados à mesma região do espaço leva a uma forte interacção entre os momentos magnéticos de spin, que tem como consequência o desdobramento dos estados de spin electrónico na ausência de campo magnético aplicado: desdobramento a campo zero ("zero field splitting"). O tipo de desdobramento observado depende do número de electrões desemparelhados. Segundo o Teorema de Kramer, os sistemas de spin multieletrónicos podem dividir-se em dois grupos:

- sistemas com um número ímpar de electrões (spin total semi-inteiro), para os quais o desdobramento a campo zero leva sempre ao aparecimento de estados de spin pelo menos duplamente degenerados (designados por doubletos de Kramer);
- sistemas com um número par de electrões (spin total inteiro), nos quais a degenerescência dos níveis de spin pode ser completamente removida por desdobramento a campo zero.

Para os sistemas com spin semi-inteiro é em geral possível obter condições experimentais que permitam observar sinais de RPE. O número de transições detectadas depende do valor do

desdobramento, caracterizado pelos parametros D e E , cuja razão E/D depende do grau de rombicidade do centro paramagnético. Quando o valor do desdobramento é pequeno em relação à energia da radiação de microondas, observam-se transições entre os dobletos de Kramer (Figura A.5); um possível efeito deste desdobramento nestes casos é o alargamento do sinal, tornando-o eventualmente não detectável.

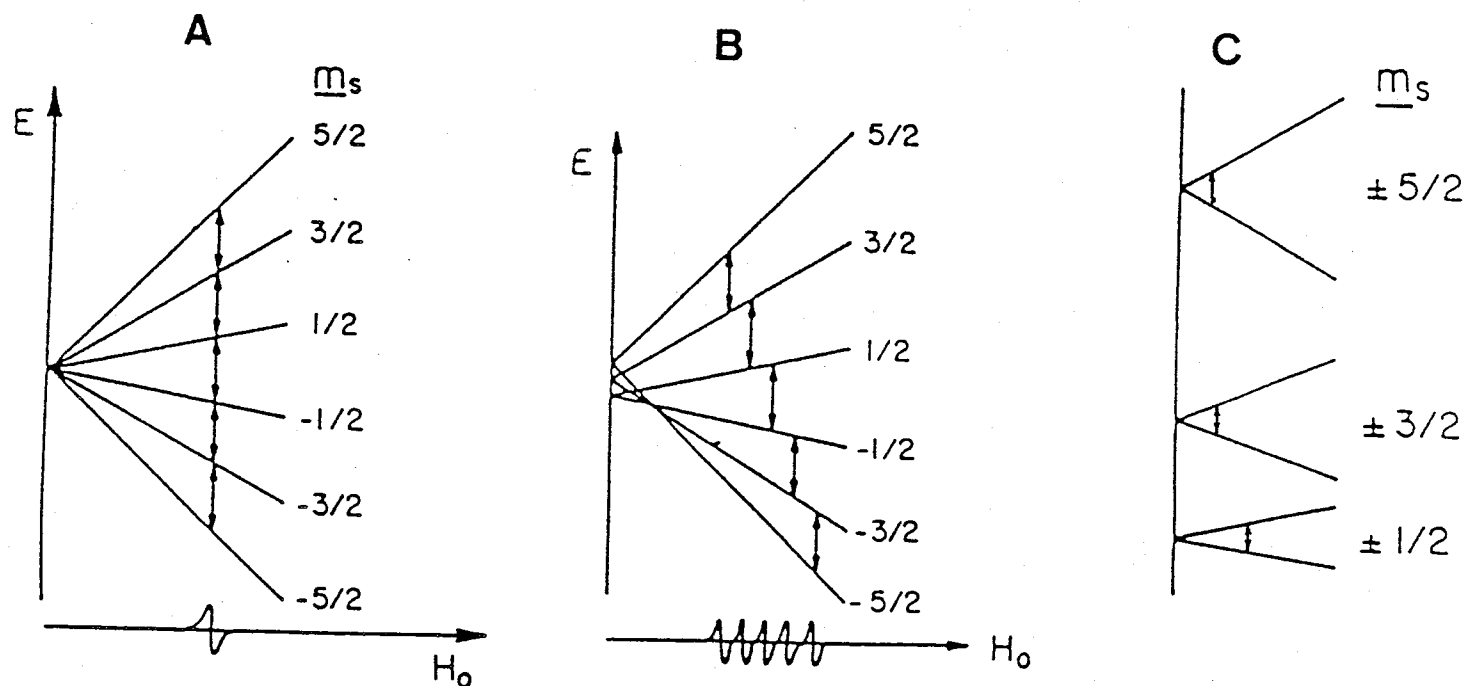


Figura A.5: Desdobramento dos níveis de spin a campo zero para um sistema com $S=5/2$
A- $D=0$; B- $D \sim h$; C- $D \gg h$

Pelo contrário, um valor de desdobramento elevado, superior à energia da radiação de microondas, impede a transição entre os dobletos; nesta situação observam-se transições dentro de cada dobleto, formalmente analisados como sistemas com spin

1/2. Os sinais de RPE podem então ser bastante complexos, podendo consistir na sobreposição de sinais devidos a cada dobleto. O espectro observado é frequentemente dependente da temperatura, pois a população de cada dobleto é determinada pela distribuição de Boltzmann.

Em sistemas de spin inteiro são observadas transições apenas entre cada estado de spin quando o valor de desdobramento é pequeno em relação à energia da radiação de microondas, sendo o espectro de RPE geralmente de difícil detecção.

A.V.3-Espectro de RPE

Em soluções geladas, que são as mais frequentes em estudos com moléculas biológicas, são possíveis todas as orientações das moléculas em relação ao campo magnético aplicado. Uma molécula orientada arbitrariamente em relação ao campo magnético terá um valor de g dado por

$$g = g_x^2 l_x^2 + g_y^2 l_y^2 + g_z^2 l_z^2$$

onde l são os cossenos directores do sistema de coordenadas do tensor g em relação à direcção do campo aplicado e g_i são os elementos principais do tensor g diagonalizado. As moléculas, relativamente raras, com o eixo dos x (ou y ou z) paralelo ao campo magnético terão valores de g iguais a g_x (ou g_y ou g_z). As outras moléculas terão valores de g compreendidos entre g_x e g_z , incluindo g_y , isto é, há moléculas para as quais a solução da equação anterior é igual a g_y , o que tem como consequência uma maior intensidade da linha a g_y em sistemas rômnicos. Quando todos os valores de g são diferentes, diz-se que o espectro é rômnico e designam-se os valores de g por g_1 , g_2 e g_3 , ou g_{min} ,

g_{med} e g_{max} ou ainda por g_x , g_y e g_z . Esta última designação só deve ser usada quando se conhece o sistemas de coordenadas da molécula. Quando dois dos valores de g são iguais, $g_1 = g_2 < g_3$ ou $g_1 = g_2 > g_3$, tem-se o caso axial: o valor único designa-se por $g_{||}$ enquanto o outro se designa por g_{\perp} . Se os valores de g forem todos iguais o espectro diz-se isotrópico.

A.V.4-Quantificação de um Espectro de RPE

A.V.4.1- Intensidade de um sinal de RPE

A intensidade de um sinal de RPE depende de vários factores:- Temperatura da amostra (T), amplitude de modulação (H_m), potência da radiação de microondas (P), valores de g do sinal, ganho do espectrómetro (G) e outros parâmetros característicos do aparelho. A quantificação é geralmente efectuada por comparação com uma substância padrão, pelo que os parâmetros dependentes do espectrómetro se mantêm constantes. Assim, as variáveis pertinentes são as directamente relacionadas com as condições de obtenção do espectro e com as características intrínsecas do sinal (valores de g):

$$I \propto H_m \cdot \sqrt{P} \cdot G \cdot 1/T$$

Para uma correcta quantificação é fundamental que o espectro tenha sido traçado em condições ideais, particularmente:

- potência de não saturação
- amplitude de modulação adequada

Tanto quanto possível, a amostra e o padrão devem ser traçados em condições idênticas, essencialmente no que se refere à temperatura. De facto, embora a intensidade de um sinal seja aproximadamente inversamente proporcional a temperatura, dentro

de uma certa gama de valores de temperatura, a variação da intensidade de cada sinal com T depende das respectivas propriedades de relaxação que, sendo provavelmente diferentes de amostra para amostra, podem levar a deficientes quantificações dos sinais.

Supondo que a concentração em spin do sistema de referência e C_r , a concentração em spin da amostra em estudo será dada por :

$$C_x = \frac{H_{mr}}{H_{mx}} \cdot \frac{\sqrt{P_r}}{\sqrt{P_x}} \cdot \frac{\Sigma x}{\Sigma r} \cdot \frac{G_r}{G_x} \cdot C_r$$

sendo as temperaturas idênticas e não considerando a correção para os valores de g. x e r referem-se, respectivamente, à amostra em estudo e à referência; Σ é a área do sinal de absorção. Supõe-se que as dimensões de ambas as amostras são idênticas, pelo que a intensidade dos sinais é então proporcional ao número de spins na cavidade e, logo, à sua concentração nas amostras.

A.V.4.2-Correção para a anisotropia de g

A probabilidade de transição em RPE é uma função dos valores de g do centro paramagnético. Assim, uma correcta quantificação de um sinal tem de entrar em conta com este factor. Aasa e Vanngard (18) deduziram uma expressão para o cálculo deste factor correctivo, que designaram por factor de intensidade g_p :

$$g_p = 2/3 [(g_x^2 + g_y^2 + g_z^2)/3]^{1/2} + 1/9 (g_x + g_y + g_z)$$

onde g_x , g_y e g_z são os valores de g do centro. A concentração em spin da amostra será então dada por

$$C_x = \frac{H_{mr}}{H_{mx}} \cdot \frac{\sqrt{P_r}}{\sqrt{P_x}} \cdot \frac{\Sigma x}{\Sigma r} \cdot \frac{G_r}{G_x} \cdot \frac{g_{pr}}{g_{px}} \cdot C_r$$

A concentração de spin por centro paramagnético será dada pela razão

$$S_c = C_x / C_c$$

onde C_c é a concentração de centros na amostra.

A.V.4.3- Integração de um sinal de RPE

O sinal de RPE é obtido geralmente na forma de primeira derivada, pelo que para calcular a sua intensidade é necessário realizar uma dupla integração. Foi utilizado um método numérico de integração.

A.V.5-Dependência com a potência de um sinal de RPE

A intensidade de um sinal de RPE, como já referido, é proporcional a $P^{1/2}$ quando não está saturado. Quando se atinge esta situação, a diferença de populações entre os níveis de Zeeman diminui o que leva a uma diminuição da intensidade do sinal de RPE. A saturação tem ainda outro efeito, relacionado com o princípio da incerteza de Heisenberg: um aumento da potência resulta num aumento da velocidade de transição entre os níveis de spin, ou seja, o tempo de vida destes estados diminui, conduzindo a um alargamento do sinal:

$$W \sim 1 / \tau \gamma$$

onde τ é o tempo de vida, W a largura de linha e γ a razão giromagnética. Vê-se assim que um aumento de potencia pode não só levar a uma deficiente quantificação do sinal mas também á sua distorção. Em geral, para amostra biológicas, o alargamento das

linhas de RPE não é homogêneo, isto é, os centros paramagnéticos não têm um comportamento idêntico. De facto, a linha observada é um envelope de vários componentes individuais. Esta não homogeneidade resulta de diversos factores, nomeadamente i) não homogeneidade do campo magnético no volume da amostra, ii) estrutura fina não resolvida, iii) estrutura hiperfina, iv) interacção dipolar entre spins com diferentes frequências de Larmor, v) "g strain" e vi) população heterogênea dos centros.

A intensidade de um sinal de RPE (S) depende da potência de modo mais complexo, dado pela seguinte equação (19)

$$S = P^{1/2} (1 + P/P_{1/2})^{-b/2}$$

onde $P_{1/2}$ é a potência de meia saturação e b é o parametro de não homogeneidade, que pode tomar valores entre 1 (caso de alargamento de linha não homogêneo) e 4 (caso homogêneo). Estes dois parâmetros podem ser calculados por ajuste da equação aos valores experimentais, fazendo-se geralmente a representação gráfica indicada na figura A.6 de $\log(S/P^{1/2})$ em função de $\log P$.

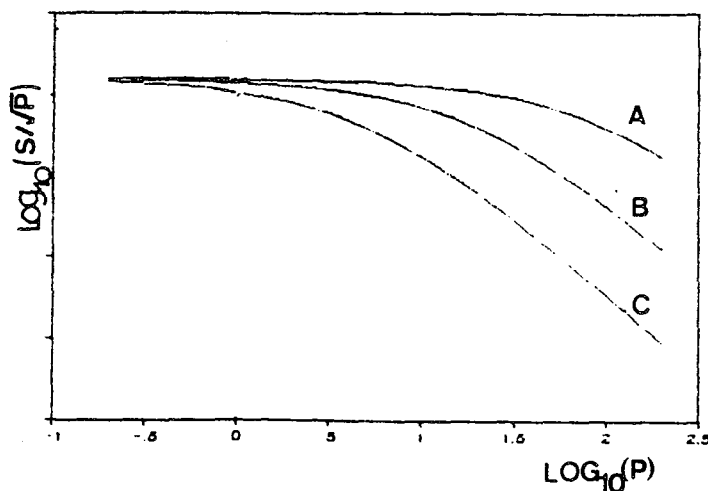


Figura A.6: Dependência com a potência de microondas de um sinal de RPE. Curvas calculadas pela equação apresentada no texto para os seguintes valores de $P_{1/2}$: A- 100 mW, B- 20 mW, C- 5 mW ($b=1$).

Uma linha paralela à abcissa indica ausência de saturação nessa gama de potências. O valor de $P^{1/2}$ corresponde ao ponto de intersecção das linhas paralela e descendente, com declive limite de $-0,5$ b. Com base nos resultados experimentais obtidos neste trabalho fez-se um ajuste daquela função para obter estimativas destes dois parâmetros; utilizou-se um método de regressão quadrática para equações não lineares.

A dependência da intensidade de um sinal de RPE com a temperatura está também relacionada com a potência: a temperaturas baixas, a intensidade do sinal diminui por saturação com a potência; a temperaturas elevadas, a intensidade decresce com o factor de Boltzmann ($1/T$) e, eventualmente, o sinal torna-se indetectável por alargamento da linha, devido ao aumento das velocidades de relaxação com a temperatura. Assim, para cada sinal há uma zona óptima de temperatura e potência para a sua detecção.

A.V.7-RPE de metais de transição- Espectros de níquel

Os iões de metais de transição, como referido atrás, têm em geral valores de g elevados, pelo que o paramagnetismo orbital é elevado, tendo como consequência um desvio dos valores de g de $g=2$. Resultam assim espectros peculiares, típicos de cada sistema d e de cada geometria dos compostos destes metais. Será analisado o caso mais simples em que o valor da constante de acoplamento spin-orbita é pequeno em relação à diferença de energias entre as orbitais envolvidas, levando a um desvio pequeno dos valores de g de $g=2$, como se verifica para iões Ni(I) e Ni(III). Nesta situação o valor de g pode ser dado pela equação (17)

$$g_i = g_e + n_i \lambda / \Delta E_i$$

onde n_i é dado por

$$n_i = 2 \cdot \langle A \rangle^2$$

sendo A o elemento de matriz do operador momento angular entre as funções de onda das orbitais d correlacionando a relação rotacional entre a orbital d contendo o electrão desemparelhado e a orbital relacionada com a primeira por rotação em torno de i. A relação entre as várias orbitais é dada na Tabela A.3; λ é a constante de acoplamento spin-orbita.

Tabela A.3: Elementos de matriz para acoplamento orbital (17)

	L_x	L_y	L_z
$d_{x^2-y^2}$	$-i d_{yz}$	$-i d_{xz}$	$2i d_{xy}$
d_{z^2}	$-i/\sqrt{3} d_{yz}$	$i/\sqrt{3} d_{xz}$	0
d_{xy}	$i d_{xz}$	$-i d_{xz}$	$-2i d_{x^2-y^2}$
d_{xz}	$-i d_{xy}$	$-i/\sqrt{3} d_{z^2} + i d_{x^2-y^2}$	$i d_{yz}$
d_{yz}	$i d_{x^2-y^2} + i/\sqrt{3} d_{z^2}$	$i d_{xy}$	$-i d_{xz}$

Na figura A.7 mostram-se os diagramas de desdobramento de orbitais d para iões Ni(III) e Ni(I) em geometrias vulgares para estes iões. Os compostos de Ni(III), um sistema d^7 , são geralmente de spin baixo. Numa geometria octaédrica com distorção rômica o estado fundamental é definido como $(d_{xz}, d_{yz})^4 (d_{xy})^2 (d_{z^2})^1 (d_{x^2-y^2})^0$, ou seja, o electrão desemparelhado encontra-se numa orbital d_{z^2} . Aplicando a equação anterior, os valores de g são dados pelas expressões seguintes:

$$g_x = 2 - 6 \lambda / \Delta E(d_z^2 - d_{yz})$$

$$g_y = 2 - 6 \lambda / \Delta E(d_z^2 - d_{xz})$$

$$g_z = 2$$

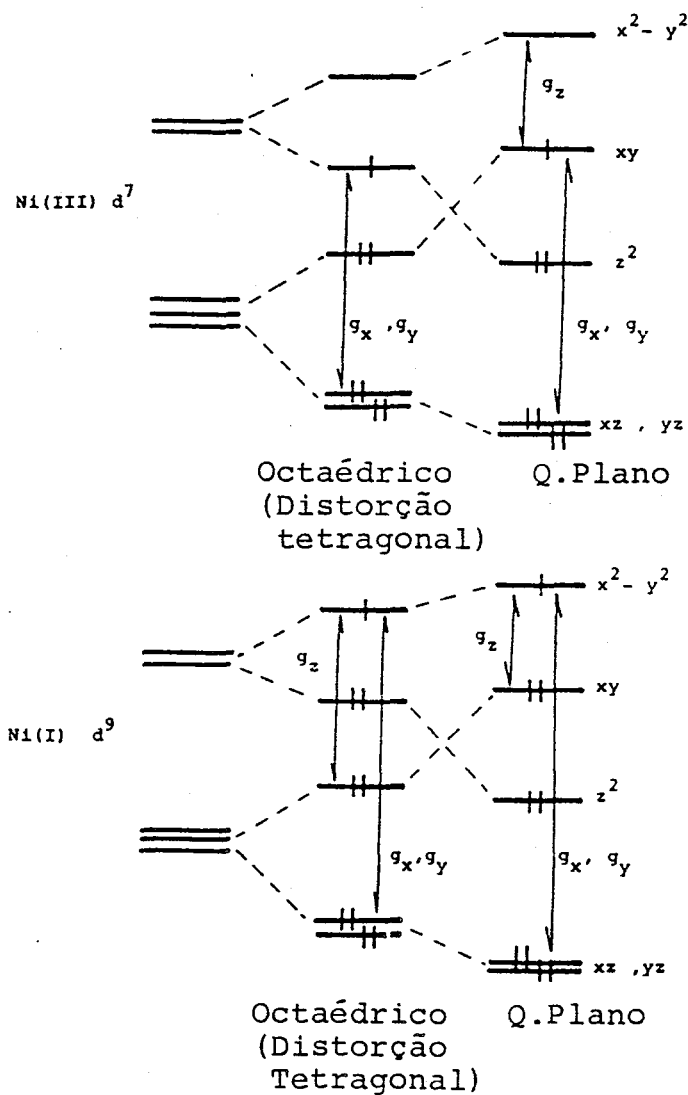


Figura A.7: Diagrams de desdobramento de orbitais d para iões Ni(I) e Ni(III)

No caso de geometria tetragonal, d_{xz} e d_{yz} são degenerados, vindo $E(d_z^2 - d_{yz}) = E(d_z^2 - d_{xy}) = \Delta E$, pelo que os valores de g são

$$g_x = g_y = g_{\perp}$$

$$g_z = g_{\parallel}$$

com

$$g_{\perp} = 2 - 6 \lambda / \Delta E$$

$$g_{||} = 2$$

vindo $g_{\perp} > g_{||}$ (λ tem um valor negativo para o ião Ni(III) livre, (20)).

Estas equações indicam que para o ião Ni(III), em geometria octaédrica, os valores de g_x e g_y são superiores a 2, com $g_x, g_y > g_z$, e g_z com um valor próximo de 2, tal como se verifica para a maioria dos sinais de RPE de níquel nas hidrogenases [NiFe]. Para um campo de ligandos com geometria quadrangular plana a configuração electrónica do estado fundamental é $(d_{xz}, d_{yz})^4 (d_z^2)^2 (d_{xy})^1 (d_{x^2-y^2})^0$, sendo os valores de g dados por

$$g_x = 2 - 2 \lambda / \Delta E (d_{xy} - d_{xz})$$

$$g_y = 2 - 2 \lambda / \Delta E (d_{xy} - d_{yz})$$

$$g_z = 2 - 8 \lambda / \Delta E (d_{xy} - d_{x^2-y^2})$$

Neste caso todos os valores de g se afastam de 2. Se as orbitais d_{xz} e d_{yz} forem degeneradas

$$g_x = g_y = g_{\perp}, \quad g_z = g_{||}$$

$$\text{com } g_{\perp} < g_{||}$$

No estado monovalente, Ni(I), um sistema d^9 , o electrão desemparelhado encontra-se numa orbital $d_{x^2-y^2}$. Uma análise semelhante a efectuada para o ião Ni(III) mostra que os valores de g devem ser todos diferentes de 2, e, no caso de geometria axial, com $g_{||} > g_{\perp}$.

Para uma previsão dos valores de g em cada caso é neces-

sário o conhecimento dos valores de ΔE . A análise anterior mostra que é difícil, *a priori*, e apenas a partir dos valores de g de um sinal de RPE de níquel, atribuir um dado estado de oxidação a íons níquel ou seja, distinguir entre os estados de oxidação que podem dar origem a sinais de RPE típicos de sistemas com $S=1/2$ (Ni(I) e Ni(III)).

A.V.8-Instrumentação utilizada

A espectroscopia de ressonância Paramagnética electrónica foi efectuada num espectrómetro Bruker 200-tt (Banda de frequência X), equipado com um criostato de fluxo de hélio ESR- (Oxford Instruments Co., Oxford, UK), e um computador Nicolet 1180, onde se realizaram as manipulações matemáticas dos espectros.

A integração dos espectros foi efectuada usando padrões de CuEDTA e a Ferredoxina II oxidada de *D. gigas*.

A simulação dos espectros de RPE foi realizada utilizando um programa de simulação para espectros rômnicos de amostras em pó, usando o factor de intensidade de Aasa e Vanngard g_p para calcular a intensidade de cada transição. O programa foi cedido pelo Prof. B.H.Huymh e adaptado a um computador DATA General - Eclipse S/140.

A.VI-Espectroscopia de Mössbauer (21-24)

A espectroscopia de Mössbauer foi utilizada em colaboração com o Prof. B.H. Huynh, do Department of Physics da University of Emory (Atlanta, Georgia, USA). Esta técnica espectroscópica revelou-se nos últimos anos extremamente poderosa para o estudo de proteínas contendo ferro, nomeadamente as proteínas contendo

centros ferro-enxofre, em particular em estudos conjugados com a espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica. Os princípios básicos da espectroscopia de Mössbauer serão referidos brevemente, salientando-se em particular a sua relação com a espectroscopia de RPE.

A espectroscopia de Mössbauer consiste na absorção nuclear por ressonância de raios γ , sem recuo. Baseia-se em transições entre níveis de spin nuclear que, no caso do isótopo de ferro ^{57}Fe , são as transições entre o estado fundamental com $I=1/2$ e o estado excitado com $I=3/2$. A fonte de radiação é específica para o núcleo em estudo. De entre os isótopos de ferro, apenas o isótopo ^{57}Fe é detectado por Mössbauer, usando-se como fonte de radiação uma fonte de cobalto ^{57}Co (emissão de raios γ de 14,4 eV). Devido à baixa abundância natural do isótopo ^{57}Fe (cerca de 2 %), é necessário o uso de amostras muito concentradas ou o seu enriquecimento naquele isótopo de ferro.

A variação da energia da fonte de radiação é efectuada por movimento linear dessa fonte em relação á amostra, utilizando-se o efeito de Doppler, pelo que os parâmetros de Mössbauer são dados em unidades de velocidade (mm/s). O espectro de Mössbauer consiste na representação da transmissão relativa de raios γ em função da velocidade da fonte, utilizando-se como referência o ferro metálico. A forma e posição das linhas do espectro de Mössbauer depende fundamentalmente de dois factores, resultantes de interacções hiperfinas do núcleo com campos eléctricos e magnéticos vizinhos.

A.VI.1-Interacção electrónica hiperfina-

A interacção electrónica hiperfina resulta de interacções eléctricas monopolares e quadrupolares do núcleo com a vizinhança electrónica, caracterizada pelo desvio isomérico, δ , e pelo desdobramento de quadrupolo, ΔE_Q . O núcleo de ^{57}Fe no estado excitado tem um raio inferior ao do estado fundamental, pelo que a energia a que ocorre a transição de Mössbauer depende da densidade electrónica no núcleo. O desvio isomérico constitui uma medida qualitativa do estado de oxidação, do tipo de coordenação e do grau de covalência em compostos de ferro, sendo um parâmetro bastante útil, essencialmente no estudo de séries homólogas de compostos (por exemplo, para centros Fe/S em diversas estruturas ou estados de oxidação). Por outro lado, o estado excitado, com $I=3/2$, possui um momento de quadrupolo eléctrico que, por interacção com o gradiente de campo eléctrico da vizinhança electrónica do núcleo, leva ao desdobramento do quarteto de $I=3/2$ em dois doubletos ($\pm 1/2$, $\pm 3/2$), enquanto o estado fundamental se mantém degenerado. Observam-se por isso duas transições, designando-se o espectro por um doubleto de quadrupolo. A diferença de energia entre as duas transições é caracterizada pelo desdobramento de quadrupolo, ΔE_Q . Os dois parâmetros δ e ΔE_Q permitem, em séries homólogas de compostos de ferro, uma caracterização preliminar da estrutura electrónica do composto. Na figura A.8 esquematizam-se os espectros de Mössbauer obtidos atendendo às interacções de monopolo e de quadrupolo.

A.VI.2-Interacção magnética hiperfina-

A interacção magnética hiperfina resulta da interacção

entre o momento magnético de spin nuclear e campos magnéticos na vizinhança do núcleo, que podem ser internos (sistema paramagnético) ou aplicados à amostra. Esta interacção resulta no desdobramento dos níveis de spin nuclear em $2I+1$ níveis, observando-se seis linhas no espectro de Mössbauer, obedecendo às regras de selecção $\Delta m_I = 0, \pm 1$ e $\Delta I = 1$ (Figura A.8).

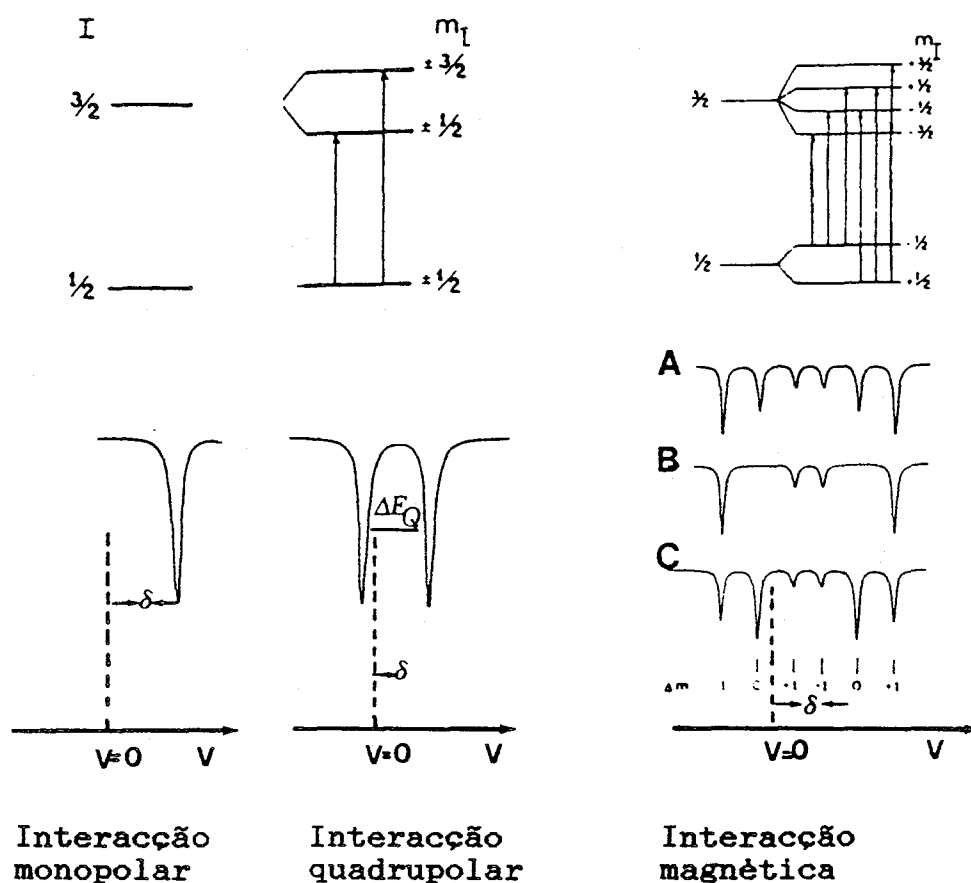


Figura A.8: Espectros de Mössbauer esquemáticos traduzindo diversos tipos de interacção hiperfina (ver texto)

As características dos espectros de Mössbauer magnéticos serão analisadas com maior detalhe, salientando-se a correlação entre o tipo de espectro de Mössbauer que se observa e o espectro de RPE correspondente.

O espectro de Mössbauer magnético mais simples resulta

quando um campo magnético efectivo actua no núcleo de ^{57}Fe . O desdobramento dos estados nucleares fundamental e excitado pode ser calculado pelo Hamiltoniano

$$\hat{H} = - g_n \beta_n \bar{I} \cdot \bar{H}_{\text{ef}}$$

onde $g_n \beta_n \bar{I}$ é o momento magnético de spin nuclear e H_{ef} é o campo magnético efectivo sentido pelo núcleo. Em geral o operador Hamiltoniano pode ser separado num termo electrónico H_e e num termo traduzindo a interacção hiperfina magnética H_{hf}

$$\hat{H} = \hat{H}_e + \hat{H}_{\text{hf}}$$

onde

$$\hat{H}_e = D[(S_z^2 - S(S+1)/3 + \lambda(S_x^2 - S_y^2))] + \beta \bar{S} \cdot \bar{g} \cdot \bar{H}$$

$$\hat{H}_{\text{hf}} = \bar{S} \cdot \bar{A} \cdot \bar{I} - g_n \beta_n \bar{I} \cdot \bar{H}$$

O termo de desdobramento a campo zero do sistema electrónico (parâmetros D e E) e o termo de interacção de Zeeman são em geral grandes em relação às interacções hiperfinas. Assim, os termos electrónicos definem o eixo de quantização electrónica, o que permite reescrever o Hamiltoniano nuclear, H_N substituindo S pelo valor expectável $\langle S \rangle$

$$\hat{H}_N = \langle \bar{S} \rangle \cdot \bar{A} \cdot \bar{I} - g_n \beta_n \bar{I} \cdot \bar{H}$$

$$= - g_n \beta_n \bar{I} (- \langle \bar{S} \rangle \bar{A} / (g_n \beta_n) + \bar{H})$$

$$\hat{H}_N = - g_n \beta_n \bar{I} (\bar{H}_{\text{int}} + \bar{H}) = - g_n \beta_n \bar{I} \cdot \bar{H}_{\text{ef}}$$

O termo

$$H_{\text{int}} = - \langle \bar{S} \rangle \cdot \bar{A} / (g_n \beta_n)$$

traduz o campo magnético, que determina as características magnéticas do espectro de Mössbauer.

Na ausência de campo aplicado, os sistemas não-Kramer (S

inteiro, número par de electões), têm $\langle S \rangle = 0$, donde $H_{\text{int}} = 0$. Assim, na ausência de campo, o espectro consiste apenas num dobleto de quadrupolo. É o caso, por exemplo, de ião ferroso de baixo spin, $S=0$, e de alto spin $S=2$, de centros $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ oxidados e $[3\text{Fe}-x\text{S}]$ reduzidos ($S=2$).

Sistemas de Kramer (S semi-inteiro) são fundamentalmente diferentes: campos magnéticos intensos são observados mesmo na ausência de campo aplicado. Para $S=1/2$, o Hamiltoneano electrónico é

$$H_e = \beta \bar{S} \cdot \bar{g} \cdot \bar{H}$$

O espectro das moléculas dependerá da orientação dos eixos moleculares (sistema de eixos principal do tensor g), em relação à direcção do campo aplicado e à radiação. O spin electrónico está quantificado na direcção $H' = \bar{g} \cdot \bar{H}$, isto é, $\langle S \rangle$ tem componente não nula apenas ao longo de H' . A distribuição de H' e, daí, de $\langle S \rangle$ e H_{int} , depende essencialmente dos valores de g electrónicos.

Para um sistema isotrópico não há direcção preferencial, pelo que H' , $\langle S \rangle$ e H_{int} são paralelos ao campo aplicado. Se o campo for aplicado paralelamente à radiação, cada núcleo sente um campo magnético paralelo àquela radiação; nesta situação são proibidas transições com $\Delta m = 0$, observando-se um espectro de tipo B (Figura A.8); se o campo for aplicado perpendicularmente à radiação observa-se um espectro do tipo C. Efectuando um espectro de diferença B-C, observam-se as transições de $m=0$. Para sistemas não isotrópicos mas em que os valores de g são relativamente próximos observam-se espectros com as mesmas características. A detecção de um sinal de Mössbauer fortemente dependente do campo é uma indicação clara de que se deve observar um sinal de

RPE intenso.

Se o tensor g for uniaxial, $g_x = g_y = 0$, o sistema é silencioso em RPE, e o espectro é independente da direcção do campo aplicado.

No caso de serem detectados dois espectros de Mössbauer, dependentes da direcção do campo, mas apenas se observa um sinal de RPE, então o spin electrónico é partilhado pelos dois centros associados aos sinais de Mössbauer.

Em resumo, pode dizer-se que centros paramagnéticos de ferro podem ser diferenciados e caracterizados usando as espectroscopias de Mössbauer e de RPE. Para um sistema com um número par de electrões desemparelhados, não se observa em geral um sinal de RPE. Na ausência de campo aplicado, o espectro de Mössbauer consiste num dobleto de quadrupolo. Se o sistema for paramagnético ($S > 0$), distingue-se de um sistema diamagnético por aplicação de um campo magnético externo. Pelo contrário, para um sistema com um número impar de electrões desemparelhados, o espectro de Mössbauer é alargado mesmo na ausência de campo magnético externo. Na presença de um campo fraco podem distinguir-se dois tipos de doubletos de Kramer: um, silencioso em RPE, com valores de g perto de zero, com um espectro de Mössbauer independente da direcção do campo aplicado; outro, activo em RPE, com pelo menos dois valores de g distintos de zero, com espectro de Mössbauer dependente da direcção do campo aplicado. A espectroscopia de Mössbauer é, pois, particularmente útil para o estudo de proteínas contendo ferro, pois permite a detecção de todos os átomos de ferro da amostra, independentemente dos estados de oxidação e de spin, levando à caracterização dos tipos de

centros enzimáticos de ferro, para além de permitir a quantificação dos sinais.

A.VII-Referências

- 1) J.LeGall, G.Mazza and N.Dragoni, (1965), Biochim.Biophys.Acta, 99, 385-387
- 2) B.A.Blaylock and T.C.Stadtman, (1966), Arch.Biochem. Biophys. Res., 67, 138-158
- 3) R.W.Brauer and R.Levin, (1951), J.Lab.Clin.Med., 38, 474-479
- 4) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Fan and R.J.Randall, (1951), J.Biol.Chem., 193, 265-275
- 5) D.S.Fisher and D.C.Price, (1964), Clin.Chem., 10, 21-25
- 6) B.J.Davis, (1964), Ann.N.Y.Acad.Sci., 121, 404-427
- 7) K.Weber and M.Osborn, (1969), J.Biol.Chem., 244, 4406
- 8) G.Virella, (1974), "Separação electroforética de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de sulfato dodecilico de sódio", F.C.Gulbenkian, Lisboa
- 9) J.R.Whitaker, (1963), Anal.Chem., 35, 1950-1953
- 10) P.L.Dutton, (1971), Biochim.Biophys.Acta, 226, 63-80
- 11) H.D.Peck, Jr. and H.Gest, (1956), J.Bacteriol., 71, 70-80
- 12) Y.M.Berlier, B.Dimon, G.Fauque and P.A.Lespinat, (1985), in "Gas enzymology", ed. H.Degn, R.P.Cox and H.Toftlund, Reidel Publishing Company, pp. 17-35
- 13) P.F.Knowles, D.Marsh, H.W.Rattle, (1976), "Magnetic Resonance of biomolecules", John Wiley & Sons, London
- 14) H.M.Swartz, J.R.Bolton and D.C.Borg, (eds.), "Biological Applications of Electron Spin Resonance", (1972), Wiley-Interscience, USA

- 15) J.E.Wertz and J.R.Bolton, (1972), "Electron Spin Resonance", McGraw-Hill, USA
- 16) G.Palmer, (1979), in "Methods for Determining Metal Ion Environments in Proteins", ed. D.W.Durnall and R.G.Wilkins, Elsevier, N.Y., pp. 153-181
- 17) G.Palmer, (1985), Biochem.Soc.Trans., 13, 548-560
- 18) R.Aasa and T.Vanngard, (1975), J.Magn.Res., 19, 308-315
- 19) H.Rupp and A.L.Moore, (1979), Biochim.Biophys.Acta, 548, 16-29
- 20) F.Bossu, C.Murray and D.Margerum, (1978), Inorg.Chem., 17, 1630-1634
- 21) B.H.Huynh and T.A.Kent, (1984), "Mössbauer studies of iron Proteins", in "Advances in Inorganic Biochemistry", eds. G.L.Eichorn and G.L.Marzilli, Elsevier, Amsterdam
- 22) E.Münck, (1978), in "Methods in Enzymology", Vol. LIV, Academic Press, pp.346-375
- 23) B.H.Huynh, E.Münck and W.H.Orme-Johnson, (1982), in "The Biological Chemistry of Iron", ed. H.B.Dunford, D.Reidel. Pub.Co., pp. 241-258
- 24) E.Münck and B.H.Huynh, (1979), in "ESR and NMR of Paramagnetic species in Biological and Related systems", ed. I.Bertini and R.S.Drago, D.Reidel. Pub. Co., pp.275-288